



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA**

**EFEITOS DO TREINAMENTO AERÓBIO SOBRE SINAIS PRECOSES DO
REMODELAMENTO DO VENTRÍCULO ESQUERDO INDUZIDO PELO DIABETES
MELLITUS EXPERIMENTAL**

FLÁVIO SANTOS DA SILVA

Natal

2014

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA**

**EFEITOS DO TREINAMENTO AERÓBIO SOBRE SINAIS PRECOSES DO
REMODELAMENTO DO VENTRÍCULO ESQUERDO INDUZIDO PELO DIABETES
MELLITUS EXPERIMENTAL**

FLÁVIO SANTOS DA SILVA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito para obtenção do título de Mestre em Fisioterapia.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto Lavezzo Dias

Co-orientador: Prof. Dr. Bento João da Graça Azevedo Abreu

Natal

2014

UFRN / Biblioteca Central Zila Mamede
Catalogação da Publicação na Fonte

Silva, Flávio Santos da

Efeitos do treinamento aeróbio sobre sinais precoces do remodelamento do ventrículo esquerdo induzido pelo diabetes mellitus experimental. / Flávio Santos da Silva. – Natal, RN, 2014.

63 f. ; il.

Orientadores: Prof. Dr. Fernando Augusto Lavezzo Dias e Prof. Dr. Bento João da Graça Azevedo Abreu.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia.

1. Diabetes Mellitus Tipo 1 – Dissertação. 2. Miocárdio – Dissertação. 3. Fibrose – Dissertação. 4. Exercício Aeróbico – Dissertação. 5. Ratos – Dissertação. I. Dias, Fernando Augusto Lavezzo. II. Abreu, Bento João da Graça Azevedo. III. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. IV. Título.

RN/UF/BCZM

CDU 616.379-008.64

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA**

**EFEITOS DO TREINAMENTO AERÓBIO SOBRE SINAIS PRECOSES DO
REMODELAMENTO DO VENTRÍCULO ESQUERDO INDUZIDO PELO DIABETES
MELLITUS EXPERIMENTAL**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fernando Augusto Lavezzo Dias - Departamento de Fisiologia / UFPR

Prof. Dr. Pedro Dal Lago - Departamento de Fisioterapia / UFCSPA

Prof^a. Dr^a. Selma Sousa Bruno - Departamento de Fisioterapia / UFRN

Aprovado em ___/___/___

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA**

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia:
Prof. Dr. Jamilson Simões Brasileiro

AGRADECIMENTOS

À minha família. Amo vocês! Obrigado por tudo! Abraços, Lipe e Raphael, meus irmãos!

À minha querida namorada, Naiara Paula, quem mais me animava nos momentos de dificuldade. Seu amor é tão lindo quanto você. Dedico a você este trabalho!

Ao Professor Bento Abreu. Você é o melhor, professor! Saiba que você contribuiu para fazer de mim o melhor que eu poderia ser, não apenas como aluno.

Ao professor Fernando Dias. Dentre muitas coisas, sou especialmente grato por seu exemplo de reponsabilidade e empenho. Você foi um dos pouquíssimos professores que tive o privilégio de ouvir a instrução e observar o proceder, no mesmo nível.

Aos professores João Paulo, Adriana Rezende, Selma Bruno e Naisandra Bezerra. Guardei comigo desde o mais breve ensinamento que me forneceram.

Ao pessoal do Glicomol. O que falta em espaço lá no laboratório, sobra em inteligência e boa vontade em vocês! Sempre tive muita admiração por todos.

Ao Diego Neves Araújo... Eu jamais poderia imaginar um colega de pesquisa mais inteligente e gente boa! Você fez muito por mim.

Ao Raul Bortolin, responsável por grande parte do meu êxito. Espero um dia ser tão bom em Biologia Molecular quanto você.

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Norte (FAPERN), pelo Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), e contou com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS _____	viii
LISTA DE FIGURAS E TABELAS _____	ix
RESUMO _____	x
ABSTRACT _____	xi
1. INTRODUÇÃO _____	1
1.1. Diabetes Mellitus e sua Relação com o Músculo Cardíaco _____	2
1.2. Papel Cardioprotetor do Exercício Físico no Diabetes Mellitus _____	5
1.3. Hipóteses _____	6
2. OBJETIVOS _____	7
2.1. Objetivo Geral _____	8
2.2. Objetivos Específicos _____	8
3. MÉTODOS _____	9
3.1. Declaração de Ética _____	10
3.2. Desenho Experimental _____	10
3.3. Indução do Diabetes Tipo 1 _____	11
3.4. Protocolo de Exercício Físico _____	12
3.5. Eutanásia dos Animais e Dissecção dos Corações _____	13
3.6. Análise Morfológica _____	14
3.6.1. Preparação Histológica do Tecido Cardíaco _____	14
3.6.2. Avaliação do Trofismo do Ventrículo Esquerdo _____	15
3.6.3. Conteúdo de Colágeno do Ventrículo Esquerdo _____	16
3.7. Análise da Expressão Gênica de Proteínas Ligadas ao Remodelamento Cardíaco _____	16
3.7.1. Preparação do Tecido e Extração do RNA Total _____	16
3.7.2. Síntese do DNA Complementar _____	17
3.7.3. Genes Alvo e Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (qPCR) _____	17
3.8. Análise Estatística _____	18
4. RESULTADOS _____	20
4.1. Peso Corporal e Glicemia _____	21

4.2. Mortalidade _____	22
4.3. Morfologia do Ventrículo Esquerdo _____	23
4.3.1. Espessura da Parede Ventricular _____	23
4.3.2. Diâmetro dos Cardiomiócitos _____	24
4.3.3. Área de Secção Transversa dos Cardiomiócitos _____	25
4.3.4. Conteúdo Colágeno _____	26
4.4. Expressão Gênica dos Colágenos I e III, das MMPs 2 e 9, e do TGF- β 1 _	27
5. DISCUSSÃO _____	30
6. CONCLUSÃO _____	39
7. REFERÊNCIAS _____	41

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
AST	Área de Secção Transversa
AGEs	Produtos Finais da Glicação Avançada
AMP	Monofosfato de adenosina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
cDNA	DNA Complementar
CMD	Cardiomiopatia Diabética
CT	<i>Cycle threshold</i> (Limiar de Detecção da fase exponencial da qPCR)
DM1	Diabetes Mellitus Tipo 1
GAPDH	Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase
GLUT4	Proteína Transportadora de Glicose Tipo 4
HE	Hematoxilina-Eosina
MEC	Matriz extracelular
MMPs	Metaloproteases da Matriz
NAH	Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina
NADH	Estado Reduzido do NAD
mRNA	RNA Mensageiro
PSR	<i>Picrosirius Red</i>
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (Quantitativa)
RNA	Ácido Ribonucléico
STZ	Estreptozotocina
TGF- β 1	Fator de Crescimento Transformador - Beta 1
VE	Ventrículo Esquerdo
VO ₂	Consumo de Oxigênio

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Ratos em atividade na esteira motorizada durante o período de adaptação ao protocolo de treinamento _____	11
Figura 2. Desenho experimental _____	13
Figura 3. Esquema do plano de secção dos corações para exposição da face transmural do anel equatorial do VE _____	15
Figura 4. Gel de formaldeído-agarose (2%) da eletroforese do RNA total _____	17
Tabela 1. Efeitos do diabetes e do exercício físico sobre o peso corporal e a glicemia _____	21
Figura 5. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier para os grupos CS, CT, DS e DT _____	22
Figura 6. Efeitos do diabetes e do exercício na espessura da parede ventricular esquerda _____	23
Figura 7. Efeitos do diabetes e do exercício no diâmetro dos cardiomiócitos _____	24
Figura 8. Efeitos do diabetes e do exercício sobre a AST dos cardiomiócitos _____	25
Figura 9. Efeitos do diabetes e do exercício no conteúdo colágeno do VE _____	26
Figura 10. Expressão de genes envolvidos no remodelamento da MEC do VE diabético _____	28
Tabela 2. Resumo do perfil de expressão dos genes alvo _____	29

RESUMO

Nosso objetivo foi investigar os efeitos de um programa de treinamento aeróbio sobre o remodelamento adverso e precoce do ventrículo esquerdo (VE), utilizando modelo experimental de curto prazo de diabetes tipo 1 (DM1). Ratos *Wistar* foram divididos em 4 grupos: controle sedentário (CS), controle treinado (CT), diabético sedentário (DS) e diabético treinado (DT). O DM1 foi induzido por estreptozotocina (45 mg/kg). O programa de treinamento consistiu em 4 semanas de corrida em esteira (13 m/min, 60 min/dia, 5 dias/semana). Ao fim dos experimentos, os corações foram coletados para análise da morfologia e do perfil transcricional do VE, com foco em seu remodelamento. Os óbitos foram registrados durante as 4 semanas. Verificamos alta mortalidade entre os animais do grupo DS, enquanto que esta foi significativamente reduzida no grupo DT. O grupo DS apresentou aumento na área de secção transversa dos cardiomiócitos e fibrose. O grupo DT exibiu redução das medidas de trofismo cardíaco, mas com relação ao conteúdo colágeno, foi similar ao grupo CS. As análises de expressão de genes ligados ao remodelamento cardíaco revelaram redução na expressão dos colágenos I e III, além de baixa expressão da MMP-2, no grupo DS. O grupo DT apresentou diminuição dos níveis de mRNA para MMP-9, e expressão gênica de MMP-2 inalterada, se comparado ao grupo CS. As expressões da MMP-2 e do TGF- β 1 foram aumentadas no grupo CT. A razão entre expressão gênica dos colágenos I e III mostrou-se elevada no grupo CT e reduzida nos grupos diabéticos. Esses resultados estabelecem alterações precoces da estrutura e do perfil transcricional do VE. Ainda, indicam que o treinamento aeróbio exerce proteção específica contra mecanismos responsáveis pelo dano cardíaco observado no DM1.

Palavras-chave

Diabetes Mellitus Tipo 1; Miocárdio; Fibrose; Exercício Aeróbico; Ratos.

ABSTRACT

Our aim was to investigate the effects of an aerobic training program on adverse and early left ventricle (LV) remodeling, using an experimental model of short-term type 1 diabetes (T1D). Wistar rats were divided in 4 groups: sedentary control (SC), trained control (TC), sedentary diabetic (SD) and trained diabetic (TD). T1D was induced by streptozotocin (45 mg/kg). The training program consisted of 4 weeks running on a treadmill (13 m/min, 60 min/day, 5 days/week). At the end of the experiments, hearts were collected for analysis of morphology and transcriptional profile of LV, by focusing on its remodeling. Deaths were recorded during the 4-week period. We verified high mortality among animals of DS group, whereas it was significantly reduced in DT group. DS group also showed an increase in cross-sectional area of cardiomyocytes and fibrosis. TD group exhibited reduction in measures of cardiac trophism, but with respect to collagen content, it was similar to CS group. Analysis of gene expression related to cardiac remodeling revealed decreased expression of collagen I and III, as well as low expression of MMP-2 in DS group. TD group showed decreased levels of mRNA for MMP-9, and unchanged gene expression of MMP-2 when compared with the CS group. The expression of MMP-2 and TGF- β 1 were increased in CT group. The ratio between gene expression of collagen I and III was increased in the CT group and decreased in diabetic groups. These results establish early changes of the structure and transcriptional profile of LV myocardium. Moreover, they indicate that aerobic exercise training plays specific protection against mechanisms responsible for cardiac damage observed in T1D.

Keywords

Type 1 Diabetes Mellitus; Myocardium; Fibrosis; Aerobic Exercise; Rats.

1. INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus é uma epidemia crescente em todo o mundo. Atualmente afeta mais de 5% da população global (International Diabetes Federation, 2012) e constitui um grande fator de risco para diversas doenças cardiovasculares (Khavandi *et al.*, 2009). É sabido que as complicações cardiovasculares são a maior causa de morbidade e mortalidade em pacientes diabéticos. Além disso, a literatura aponta forte relação entre essas complicações e as alterações estruturais do miocárdio observadas no diabetes. Os mecanismos pelos quais tais alterações ocorrem ainda são pouco compreendidos (Boudina & Abel, 2007; Li *et al.*, 2011).

Pesquisas recentes têm permitido uma maior compreensão da doença cardíaca no diabetes, especialmente no que se refere ao papel da hiperglicemia em sua patogênese (Aneja *et al.*, 2008). Baseado nos benefícios do exercício físico para o controle da glicemia encontrados na literatura (Gobatto *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2009), acredita-se que o treinamento físico tenha um importante papel na prevenção ou atenuação da mortalidade e de alterações estruturais cardíacas, de manifestação precoce, vistas no diabetes experimental.

É sabido que a adaptação miocárdica ao treinamento físico depende do estágio da doença (Howarth *et al.*, 2010; Shao *et al.*, 2009). Portanto, o momento em que o treinamento físico é iniciado pode ser decisivo se a intenção é prevenir ou retardar complicações cardíacas do diabetes. A literatura também defende a necessidade de estudos que envolvam análises das características morfológicas e moleculares do miocárdio, a fim de contribuir para o entendimento mais completo das alterações causadas por essa complexa desordem metabólica (Castellar *et al.*, 2011).

1.1. Diabetes Mellitus e sua Relação com o Músculo Cardíaco

O Diabetes Mellitus é uma doença endócrina difusa caracterizada por anormalidades metabólicas e complicações a longo termo. Sua prevalência é mundial e alguns autores projetam que o número de adultos diabéticos, que alcançou a marca de 371 milhões de pessoas em 2012, chegará a ultrapassar impressionantes 552 milhões de casos no ano de 2030, principalmente pelo aumento dos fatores de risco tais como sedentarismo, obesidade e demais hábitos de vida (International Diabetes Federation, 2012).

Existem dois principais tipos de diabetes, o do tipo 1 e o do tipo 2. O diabetes do tipo 1 (DM1) resulta da destruição autoimune das células β pancreáticas, resultando em insuficiência insulínica e hiperglicemia. Já o diabetes do tipo 2 ocorre por um aumento da resistência celular à ação da insulina, isoladamente ou em combinação com a deficiência insulínica. Esta forma de diabetes caracteriza-se por hiperinsulinemia e aumento gradativo da glicemia, conforme as células β pancreáticas esgotam suas reservas. Os tipos de diabetes ainda compreendem o diabetes gestacional, uma forma de intolerância à glicose desenvolvida durante a gravidez, e o diabetes causado por defeitos genéticos específicos na função das células β ou na ação da insulina, por doenças do pâncreas ou pela exposição a drogas e outros compostos químicos (American Diabetes Association, 2014; Poornima *et al.*, 2006). De maneira geral, a hiperglicemia oriunda dessa patologia causa danos profundos aos sistemas orgânicos, especialmente ao sistema cardiovascular (Shao *et al.*, 2009).

Convencionalmente, aceitava-se o conceito de que o diabetes causava disfunção cardíaca unicamente através do avanço da doença arterial coronariana ou da hipertensão arterial sistêmica. Entretanto, em 1972, Rubler e colaboradores verificaram dano miocárdico primário em corações diabéticos na ausência de tais comorbidades. Desde então, e principalmente nos últimos anos, isto tem sido confirmado por amplos estudos epidemiológicos (Kannel *et al.*, 1974; Tang, 2007). Tais evidências têm levado ao crescente reconhecimento de um processo patológico distinto, que afeta diretamente o miocárdio, denominado Cardiomiopatia Diabética (CMD). Atualmente, a CMD é definida por disfunção ventricular esquerda que ocorre independentemente de coronariopatia ou hipertensão (Khavandi *et al.*, 2009).

Sabe-se que o diabetes compromete seriamente a expectativa de vida. Do ponto de vista cardiovascular, sugere-se que indivíduos diabéticos podem ser considerados 15 anos mais velhos se comparados à população geral (Booth *et al.*, 2006; Soedamah-Muthu *et al.*, 2006). Além disso, a crescente taxa de mortalidade de origem cardíaca nesses pacientes tem sido definitivamente atribuída à CMD (Howarth *et al.*, 2010).

Achados histopatológicos presentes na CMD incluem alterações tróficas dos cardiomiócitos, deposição excessiva da matriz extracelular (MEC) e fibrose miocárdica (Aneja *et al.*, 2008). Nesse contexto, destaca-se o papel das metaloproteases da matriz (MMPs, do inglês *Matrix Metalloproteases*), um grupo de

peptidases cruciais na manutenção e degradação da MEC. Consideradas como as peptidases mais importantes na regulação do remodelamento cardíaco, as MMPs 2 e 9 têm recebido atenção especial (Li *et al.*, 2011). Estudos também indicam um relevante papel de fatores de crescimento profibróticos, como o fator de crescimento transformador (TGF)- β 1, cujos níveis apresentam-se alterados no coração diabético (Aragno *et al.*, 2008; Candido *et al.*, 2003). A MEC é uma complexa rede de proteínas estruturais em constante renovação, composta, sobretudo, pelos colágenos dos tipos I e III. No miocárdio normal, o colágeno I predomina sobre o III numa proporção aproximada de 70 : 30. A MEC fornece arcabouço para o coração, garantindo alinhamento e suporte às fibras musculares e a transmissão ordenada da força durante o ciclo cardíaco. Além disso, a determinação da complacência cardíaca depende em grande parte desta matriz não-contrátil do miocárdio (Burlew e Weber, 2002; Brower *et al.*, 2006).

Sabe-se que o colágeno possui baixos índices de renovação, consistindo numa proteína altamente susceptível a extensa modificação pela interação não enzimática com a glicose. Este tipo de interação ocorre dentro de poucas horas e resulta, inicialmente, em produtos conhecidos como bases de Schiff. Seguindo uma sequência de reações, em questão de dias, a matriz fibrosa se reorganiza sob uma forma mais estável de colágenos glicosados, denominados produtos de Amadori. Estes produtos sofrem adicional modificação química, formando os produtos finais da glicação avançada, ou AGEs (do inglês, *Advanced Glycated End-Products*). Num período de semanas a meses, os AGEs estabelecem ligações irreversíveis entre pontes cruzadas das fibras colágenas (Aneja *et al.*, 2008; Aronson, 2003).

Conseqüentemente, a hiperglicemia leva ao remodelamento das proteínas estruturais do miocárdio, gerando múltiplos efeitos adversos sobre as propriedades eletrofisiológicas e mecânicas do músculo cardíaco. Por meio da fibrose, especificamente, o diabetes resulta em rigidez diastólica (Burlew e Weber, 2002), comprometimento da condutividade elétrica (Eckardt *et al.*, 2000; Spach e Boineau, 1997) e, após prolongado período de acúmulo de colágeno, pode ocorrer disfunção sistólica e fração de ejeção reduzida (Capasso *et al.*, 1990; Diez *et al.*, 2005).

1.2. Papel Cardioprotetor do Exercício Físico no Diabetes Mellitus

O tratamento da CMD possui grande relevância clínica, visto o seu papel no desenvolvimento da insuficiência cardíaca (Aneja *et al.*, 2008). Embora o efeito do controle glicêmico na CMD venha sendo estudado de maneira pouco ampla, evidências sugerem que o adequado controle glicêmico é benéfico, ao menos nos estágios iniciais da disfunção do músculo cardíaco (Von Bibra *et al.*, 2004; Von Bibra *et al.*, 2007; Hordern *et al.*, 2007). Evidências mostram que a CMD não se desenvolve em pacientes com DM1 rigorosamente controlada, suportando a ideia de um importante papel da hiperglicemia na patogênese da CMD (Konduracka *et al.*, 2007). Desse modo, o bom controle glicêmico é provavelmente o mais importante componente no tratamento global da CMD. Contudo, recomendações precisas a respeito da escolha da terapia para a redução da glicemia em pacientes com CMD não podem ser feitas por falta de evidência (Aneja *et al.*, 2008; Khavandi *et al.*, 2009).

Atualmente, a prática regular de exercício, aliada ao tratamento insulínico e ao planejamento da dieta, tem sido considerada uma das principais abordagens no tratamento do diabetes (De Angelis *et al.*, 2006). Ao passo que o sedentarismo apresenta-se como um importante preditor de complicações e mortalidade nesse contexto (Mostarda *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2007). Estudos têm mostrado efeitos benéficos do exercício no controle da glicemia (Gobatto *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2009). Sabe-se que o estímulo da contração muscular leva à translocação do GLUT4, o principal tranportador de glicose no miocárdio, para a membrana plasmática pela via de sinalização da proteína cinase AMP-ativada. Este processo leva ao aumento da captação da glicose (Machado *et al.*, 2006) e tem, conseqüentemente, grande influência no controle glicêmico do paciente diabético.

Entretanto, o conjunto de evidências relacionadas aos benefícios do exercício no coração diabético continua escasso (Howarth *et al.*, 2010). Os poucos achados, provenientes de estudos com animais, indicam que o treinamento aeróbio melhora o débito cardíaco, a contratilidade e o relaxamento do miocárdio (Broderick *et al.*, 2005; De Angelis *et al.*, 2000; Loganathan *et al.*, 2007; Shao *et al.*, 2009), parâmetros cujas alterações constituem conseqüências funcionais tardias da CMD. Deve-se ter em mente que essas anormalidades manifestam-se de modo gradativo, em meio a um ambiente metabólico caracterizado pela hiperglicemia, e que estão

relacionadas ao remodelamento miocárdico adverso. De fato, os determinantes dos prejuízos funcionais de manifestação tardia na CMD são a distrofia cardíaca e a fibrose (Khavandi *et al.*, 2009), sendo esta, irreversível (Copaja Soto *et al.*, 2008).

Apesar de tais considerações, ainda não foi investigado em que grau se apresenta o remodelamento cardíaco adverso, em modelo de diabetes de curto prazo. Exceto pelos achados de biópsia, os estudos conduzidos até o momento priorizaram avaliar parâmetros funcionais do coração diabético, ou, de outro modo, utilizaram-se de longos períodos experimentais (mínimo de seis semanas) (Black *et al.*, 2010; Broderick *et al.*, 2005; Castellar *et al.*, 2011; Ares-Carrasco *et al.*, 2009; De Angelis *et al.*, 2000; Howarth *et al.*, 2010; Lahaye *et al.*, 2010; Loganathan *et al.*, 2007; Shao *et al.*, 2009). Sem dúvida, tais estudos têm cooperado com o esclarecimento de muitas questões. No entanto, o seu desenho experimental pode ocultar possíveis alterações estruturais precoces da CMD, bem como potenciais efeitos cardioprotetores do exercício.

1.3. Hipóteses

Dentre as questões que permanecem sem resposta, destaca-se: será que o remodelamento da MEC, precedente à disfunção ventricular, estaria presente em uma fase mais inicial do diabetes (em um mês, por exemplo)? Visto que a adaptação miocárdica ao treinamento físico depende do estágio da doença, é importante considerar essa possibilidade a fim de que sejam alcançados melhores efeitos com o exercício, isto é, antes que maiores complicações se desenvolvam (Howarth *et al.*, 2010; Shao *et al.*, 2009).

Considerando-se o que foi exposto acima, o presente estudo trabalha com as seguintes hipóteses: 1) quatro semanas de exposição ao DM1 são suficientes para causar remodelamento cardíaco adverso, com evidentes alterações estruturais e moleculares, além de comprometer a sobrevivência dos animais; 2) o treinamento aeróbio é capaz de proteger o VE contra tais alterações e intervir de forma benéfica nas taxas de mortalidade dos mesmos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Verificar os efeitos de um programa de exercício físico aeróbio sobre o remodelamento adverso do VE, quatro semanas após indução do DM1 em ratos.

2.2. Objetivos Específicos

- Verificar se o DM1 de curto prazo interfere na estrutura do VE, utilizando técnicas histológicas para morfometria do trofismo cardíaco e quantificação da fibrose intersticial;
- Avaliar se o DM1 de curto prazo altera o perfil de expressão gênica dos colágenos I e III, das MMPs 2 e 9, e do TGF- β 1, através de técnicas de biologia molecular;
- Observar se o DM1 de curto prazo compromete a sobrevivência dos animais, no transcorrer do período experimental.
- Analisar se o treinamento aeróbio é capaz de intervir nos possíveis danos supracitados.

3. MÉTODOS

3.1. Declaração de Ética

Todos os procedimentos foram realizados conforme as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (CEUA-UFRN), sob o protocolo de número 017/2009. Esforços foram feitos para se minimizar o número de animais utilizados e seu sofrimento durante os experimentos.

3.2. Desenho Experimental

Este estudo foi conduzido em ratos machos *Wistar*, com 90 dias de idade, pesando entre 250 e 300 g, provenientes do biotério do Centro de Ciências da Saúde da UFRN. Os animais permaneceram alojados em gaiolas de polipropileno (3 animais por gaiola), em ambiente isolado, sob condições controladas de temperatura ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) e de iluminação (ciclo claro-escuro de 12:12 horas), com livre acesso à ração e água.

Inicialmente, todos os ratos passaram por um período de 14 dias de exposição à esteira motorizada (Insight[®] EP-131, São Paulo, Brasil), como mostrado na figura 1. Esse procedimento visou à aclimatação dos animais ao ambiente de treinamento, bem como sua adaptação à velocidade e à duração desejadas (Broderick *et al.*, 2005). Nos dois primeiros dias, os animais permaneceram 40 minutos na esteira desligada. Nos dias seguintes, a intensidade de treinamento foi aumentada gradativamente, partindo de 5 m/min durante 10 minutos, no terceiro dia, até alcançar 13 m/min durante 40 minutos, no último dia. O desempenho de cada rato foi registrado diariamente, segundo sua cadência e capacidade de correr num único sentido. Apenas os ratos que apresentaram estabilidade nesses quesitos foram classificados como corredores competentes. Ao final do período de adaptação, os ratos que correram de maneira competente foram destinados aos grupos treinados, enquanto que os restantes serviram como seus respectivos grupos sedentários (Broderick *et al.*, 2005). Assim, os animais ($n = 59$) foram divididos em 4 grupos, constituindo 9 ratos controles sedentários (CS), 13 ratos controles treinados (CT), 20 ratos diabéticos sedentários (DS), e 17 ratos diabéticos treinados (DT).



Figura 1. Ratos em atividade na esteira motorizada durante o período de adaptação ao protocolo de treinamento.

3.3. Indução do Diabetes Tipo 1

O diabetes experimental foi induzido 5 dias após o período de adaptação ao exercício. Sob jejum prévio de 14 horas, e anestesia (cetamina 80 mg/kg e xilazina 12 mg/kg, i. p.), os animais dos grupos DS e DT receberam dose única de estreptozotocina (STZ) (45 mg/kg de peso corporal) dissolvida em tampão citrato (10 mM, pH 4.5), por meio de injeção intravenosa (veia peniana).

Esse composto possui mecanismo citotóxico nas células β pancreáticas (Cardinal *et al.*, 1998), provocando DM1 quando administrada em animais em jejum. Segundo a literatura, com uma única administração intravenosa de 45-60 mg/kg de STZ (Black *et al.*, 2010; Lahaye *et al.*, 2010), é possível observar nas células β pancreáticas a presença de núcleos picnóticos e vacúolos citoplasmáticos em apenas 3 horas. Estas manifestações indicam apoptose celular e tornam-se ainda mais severas após 12 horas da administração (Nagasao *et al.*, 2005). Dessa maneira, a STZ causa fragmentação do DNA nas células β e depleção de NAD +

NADH celular para níveis não fisiológicos, o que resulta em morte celular (Yang e Wright Jr, 2002).

Os animais do grupo CS e CT receberam a mesma dosagem de veículo (tampão citrato), sem o composto diabetogênico. Este procedimento garante que o estresse sofrido pelos animais normoglicêmicos foi igual ao dos animais que foram manipulados para a indução do diabetes. Após 48 horas, os animais foram pesados e a glicemia (jejum de 6 horas) foi verificada por meio de amostra sanguínea retirada da veia caudal, utilizando-se glicosímetro portátil (Accu-chek Advantage, Roche Diagnostica[®], São Paulo, Brasil). Níveis glicêmicos maiores que 200 mg/dL confirmaram o diabetes experimental.

3.4. Protocolo de Exercício Físico

O protocolo de exercício físico teve início 2 dias após a indução do DM1. Os animais dos grupos CT e DT passaram por 4 semanas de treinamento em esteira, o qual envolveu 60 minutos diários, em 5 dias por semana, com velocidade máxima de 13 m/min. Cada sessão de treinamento iniciou com 10 minutos de aquecimento, quando a velocidade partia de 5 m/min até estacionar em 13 m/min, e finalizou com desaquecimento nos últimos 10 minutos, regredindo-se à velocidade inicial (Howarth *et al.*, 2010). Durante as sessões de treinamento, os animais foram monitorados em relação a qualquer desconforto e, tal como ocorreu na adaptação, foram individualmente classificados quanto ao seu desempenho como corredores. Não se utilizou choque elétrico como estímulo para a corrida dos animais. Em vez disso, sinais ocasionais de mau desempenho foram contornados com leves toques no dorso dos mesmos. Durante o repouso, os animais treinados permaneceram em suas respectivas gaiolas, em atividade livre, mantendo-se a dieta regular (ração e água *ad libitum*). A figura 2 mostra um esquema geral, que resume as etapas experimentais.

A mortalidade foi investigada no decorrer do período experimental de 4 semanas, em todos os animais ($n = 59$). Dentre os animais treinados, aqueles que exibiram incompetência na corrida em pelo menos uma das sessões de treinamento foram considerados perdas amostrais. Subtraindo-se as perdas por óbito ou mau desempenho no treinamento (3 casos no grupo CT e 5 casos no grupo DT), o

número final de ratos foi 35 (CS, $n = 9$; CT, $n = 10$; DS, $n = 8$; DT, $n = 8$). Os animais dos quatro grupos experimentais foram sacrificados 48 horas após a última sessão de exercício, o que permite excluir a influência de efeitos agudos do treinamento. De cada grupo, 3 a 5 animais forneceram corações para análises histológicas, enquanto que os experimentos de biologia molecular foram realizados com os 5 corações restantes. Mais detalhes serão descritos a seguir.



Figura 2. Desenho experimental.

3.5. Eutanásia dos Animais e Dissecção dos Corações

No dia do sacrifício, os animais foram pesados e anestesiados com solução de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (12 mg/kg), via i. p., sendo eutanasiados por toracotomia mediana e excisão dos corações. Com a abertura da cavidade torácica e exposição do coração ainda em batimento, amostras de sangue foram drenadas da veia cava inferior e coletadas em tubos heparinizados para posterior análise laboratorial da glicemia plasmática. Imediatamente, cada coração foi dissecado e imerso em paraformoldeído a 4% (3 a 5 corações por grupo) ou congelado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (5 corações por grupo). Os corações congelados, destinados às análises de expressão gênica, foram coletados com auxílio de ferramentas estéreis, livres de contaminação com RNAses. As análises histológicas, realizadas nos corações fixados em paraformoldeído, estão detalhadas a seguir.

3.6. Análise Morfológica

3.6.1. Preparação Histológica do Tecido Cardíaco

Decorridas 48 horas de fixação, cada coração foi transversalmente seccionado ao nível ventricular equatorial. Das duas porções resultantes, médio-basal e médio-apical, aproveitou-se a segunda para análise da face transmural do anel ventricular médio (Fig. 3). Nesse nível encontram-se os dois músculos papilares do VE, os quais serviram de referência anatomotopográfica para as análises das imagens. As amostras foram, então, desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina para a formação de blocos. De cada amostra, produziu-se três secções em micrótomo (5 µm de espessura), conforme o plano de secção inicialmente descrito.

As secções foram avaliadas utilizando-se protocolos padrão de coloração: hematoxilina-eosina (HE), para análise do trofismo ventricular esquerdo; e *picrosirius red* (PSR), para exame do conteúdo e composição fibróticos da MEC no VE. Em seguida, prosseguiu-se com a montagem das lâminas em resina sintética e com a aquisição de imagens digitais para quantificação.

Um examinador capacitado e cego em relação aos grupos experimentais realizou as fotografias das lâminas histológicas. Para as visualizações em luz convencional, utilizou-se um microscópio óptico AxioImager M2 (Zeiss) de campo claro, equipado com câmera de vídeo digital AxioCam Mrc (Zeiss). As análises morfométricas foram realizadas cegamente, pelo mesmo examinador, com o programa ImageJ 1.45s (National Institutes of Health, Maryland, EUA; <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>).

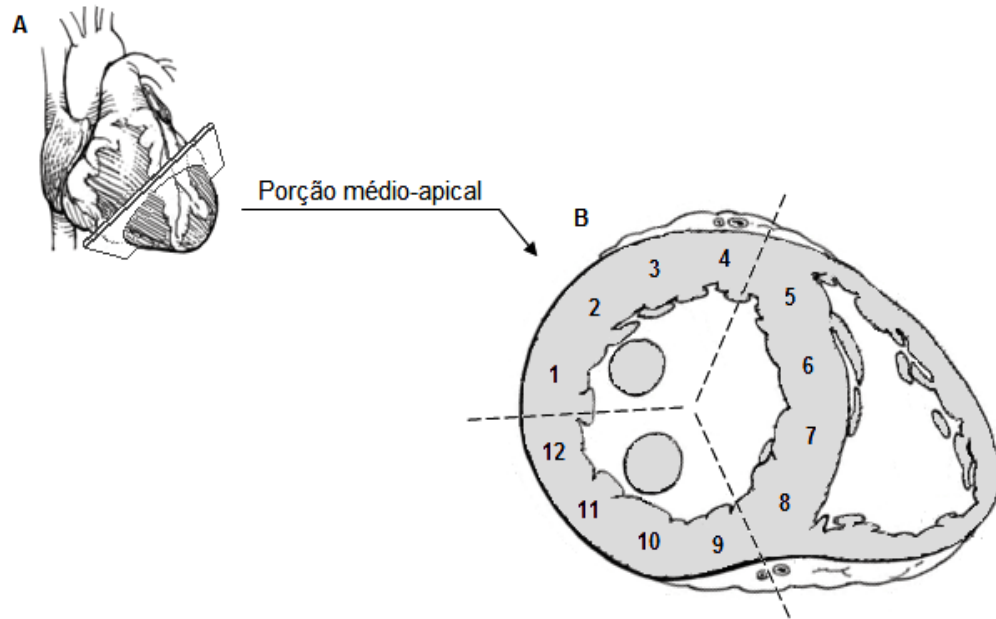


Figura 3. Esquema do (A) plano de secção dos corações para exposição da (B) face transmural do anel equatorial do VE. Divisão das paredes ventriculares em campos de observação para análise morfológica: 1 a 4, anterolateral; 5 a 8, septal; 9 a 12, posterolateral.

3.6.2. Análise do Trofismo do Ventrículo Esquerdo

O grau de trofismo de VE foi avaliado através das medidas de espessura da parede ventricular, bem como pelo diâmetro e área secção transversa (AST) dos cardiomiócitos, nas lâminas em HE, conforme adaptações dos métodos descritos por Rizzi e colaboradores (2013) e Bilim e colaboradores (2008). A espessura equatorial da parede do VE foi determinada em amplificação microscópica de 20 vezes (objetiva de 2x), utilizando-se as três secções histológicas de cada coração, através da média entre três mensurações distintas e equidistantes em cada secção. As medidas de diâmetro e de AST dos miócitos foram feitas em amplificação de 400 vezes, em um total de 120 células por coração. Como mostrado anteriormente na Fig. 3, foram consideradas as paredes anterolateral, posterolateral e septal do VE. Destas, 12 campos de observação contíguos foram analisados, de modo a melhor representar a secção ventricular. Desse modo, para cada campo, foi mensurado o diâmetro e a AST de 10 miócitos. Basicamente, o diâmetro foi obtido ao nível nuclear de miócitos orientados longitudinalmente, cujo núcleo se apresentava centralizado, com envoltório completo e bem definido. A AST foi mensurada em

células com disposição transversal ao plano de secção, situadas próximo ao endocárdio.

3.6.3. Conteúdo de Colágeno do Ventrículo Esquerdo

Para avaliar o conteúdo colágeno nas secções coradas com PSR, foram consideradas as mesmas 12 regiões de observação já descritas, em aumento de 100 vezes. Em estudo piloto foi verificado que, nessa amplificação, 12 campos observacionais (1.44 mm²/campo) representam, quase que invariavelmente, a totalidade da secção ventricular esquerda. Na microscopia de campo claro, a técnica de coloração pelo PSR resulta em áreas vermelhas, ocupadas por fibras de colágeno, em contraste com um fundo amarelo pálido, composto, neste caso, pelo citoplasma dos cardiomiócitos. Dessa maneira, a área fibrótica foi determinada através de análise bidimensional das imagens e expressa como fração de colágeno total. Em cada campo, calculou-se a porcentagem de área tecidual corada em vermelho em relação à área tecidual total, de acordo com a fórmula (Black *et al.*, 2010): % de colágeno total = (área corada em vermelho / área tecidual total) x 100.

3.7. Análise da Expressão Gênica de Proteínas Ligadas ao Remodelamento Cardíaco

3.7.1. Preparação do Tecido e Extração do RNA Total

A partir de cada coração armazenado a -80 °C, fragmentos do VE foram separados para microtubos contendo o cinco volumes do reagente estabilizador RNA/later[®] (Ambion, USA), previamente gelado, e armazenados a -20 °C até o dia da extração do RNA total. Com auxílio de ferramentas estéreis, os fragmentos foram removidos da solução estabilizadora para um almofariz e rapidamente pulverizados com pistilo, na presença de nitrogênio líquido. Logo em seguida, 30 mg do tecido pulverizado foi incorporado ao protocolo de extração do RNeasy[®] Plus Mini Kit (Qiagen, Alemanha). O RNA total extraído foi quantificado utilizando o fluorímetro Qubit[®] 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Para verificar a integridade e qualidade do RNA extraído, uma eletroforese em gel de formaldeído-agarose a 2% foi

realizada. Depois de corado, o gel foi revelado sob luz ultravioleta e fotodocumentado em sistema de captura de imagens Gel Logic 100 Imaging System (Carestream Health Inc. Rochester, NY, EUA) utilizando o software Molecular Imaging Kodak 4.5 (Figura 4).

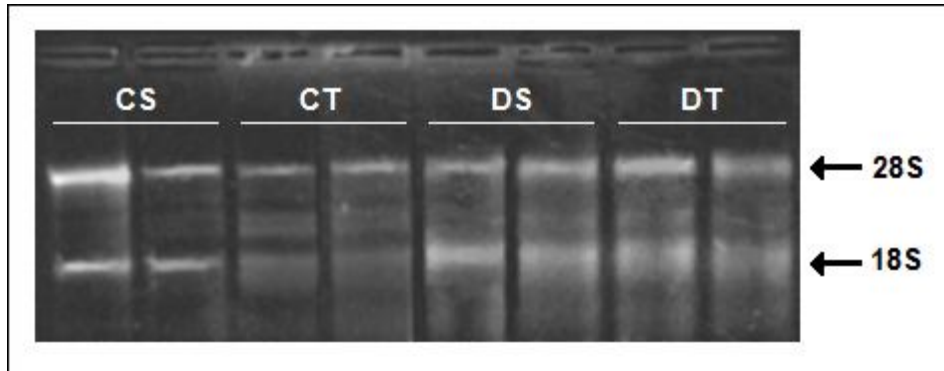


Figura 4. Gel de formaldeído-agarose (2%) da eletroforese do RNA total. Na foto, cada grupo experimental está representado por duas amostras. As duas unidades ribossômicas do RNA, 28S e 18S, estão indicadas por setas.

3.7.2. Síntese do DNA Complementar

Para a síntese da primeira fita de DNA complementar (cDNA), amostras de RNA total, padronizadas em 500 ng, foram submetidas à reação de transcrição reversa utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription, da Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA), de acordo com a metodologia descrita pelo fabricante, em termociclador MyCycler™ *Thermal Cycler* (BIORAD). Os cDNA obtidos, na concentração de 10 ng/uL, foram armazenados a -20 °C e utilizados para os ensaios de expressão gênica subsequentes.

3.7.3. Genes Alvo e Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (qPCR)

Baseado nos estudos de Candido e colegas (2003) e Daniels e colegas (2012), o presente estudo considerou os genes que codificam para o colágeno I, colágeno III, MMP-2, MMP-9 e TGF-β1. A opção por estes genes reflete o seu papel na composição e regulação da MEC cardíaca. Com sequência de cDNA completa disponível no GenBank (NCBI – National Center Biotechnology Information;

www.ncbi.nlm.nih.gov), os genes mencionados (*COL1A1*: NM_053304.1; *COL3A1*: NM_032085.1; *MMP-2*: NM_031054.2; *MMP-9*: NM_031055.1; *TGF-β1*: NM_021578.2) foram amplificados no aparelho ABI 7500 fast (Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA). A monitorização em tempo real dos produtos amplificados na qPCR foi baseada no sistema TaqMan[®], cujos ensaios de expressão gênica se encontram pré-desenhados e padronizados pela Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA). Cada amostra foi analisada em duplicata.

O gene constitutivo que codifica para a enzima Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*: NM_017008. 3) foi escolhido para a normalização dos níveis de expressão dos RNAs mensageiros (mRNAs) de interesse. Os níveis de expressão dos mRNAs que codificam para as proteínas de estudo, relativos à expressão do gene constitutivo *GAPDH*, foram calculados usando o método $2^{-\Delta\Delta C_T}$, descrito por Livak e Schmittgen (2001). Dessa maneira, o valor de C_T (do inglês, *Cycle Threshold*) indica o número sequencial do ciclo de amplificação da qPCR onde o sinal fluorescente alcança o limiar de detecção. A diferença entre o valor de C_T de cada gene alvo pelo valor de C_T do gene de referência (*GAPDH*) forneceu um valor de ΔC_T . Em seguida, por meio da subtração do valor de ΔC_T médio de cada grupo pelo valor de ΔC_T médio do grupo empregado como base para comparação (controle), chegou-se ao $\Delta\Delta C_T$. Finalmente, os dados de $\Delta\Delta C_T$ foram transformados em escala logarítmica ($2^{-\Delta\Delta C_T}$), visando comparar o nível de expressão dos genes alvo nos grupos manipulados (representado como número de vezes alterado) em relação ao grupo controle, ao qual foi atribuído o valor de 1 (Livak & Schmittgen, 2001).

3.8. Análise Estatística

Todos os cálculos estatísticos foram realizados com os programas *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS), versão 20.0 e Excel (Microsoft). Após verificação de que todas as variáveis contínuas apresentavam distribuição normal, com o teste Shapiro-Wilk, diferenças estatísticas entre os grupos foram verificadas por meio da análise de variância unifatorial (*One-way ANOVA*). Na presença de diferenças entre os grupos, comparações por pares *post hoc* foram conduzidas com

o teste da diferença honestamente significativa de Tukey. Planilhas do Excel foram utilizadas para aplicação do método de análise de expressão gênica $2^{-\Delta\Delta C_T}$ e confecção de gráficos. Curvas de sobrevida para os grupos experimentais foram construídas usando o método de Kaplan-Meier, e comparadas pelo teste de log-rank. Todos os testes foram bilaterais, e o nível de significância foi estabelecido em 5%. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média.

4. RESULTADOS

4.1. Peso Corporal e Glicemia

A tabela 1 resume os resultados relacionados aos pesos corporais e aos níveis glicêmicos dos animais. Previamente à indução do diabetes, os 35 ratos (267.41 ± 2.55 g) que compuseram os quatro grupos de estudo foram equiparados por seus pesos corporais de tal modo que não existiam diferenças significativas entre os grupos ($P > 0.05$). Ao final do período experimental de quatro semanas, foi observado ganho de peso no grupo CT, comparado com os respectivos valores iniciais ($P < 0.05$), enquanto os grupos DS e DT sofreram redução do peso corporal ($P < 0.05$). Essas mudanças contribuíram para as diferenças significativas nos pesos corporais entre os grupos diabéticos e controles ($P < 0.05$), observadas ao final do período experimental.

O estado diabético foi observado nos grupos tratados com STZ, logo ao início do período experimental, caracterizado por severa hiperglicemia ($P < 0.05$). Após 4 semanas, foram verificados níveis glicêmicos ainda maiores no grupo DS, em relação aos respectivos valores iniciais ($P < 0.05$). Aparentemente, o treinamento físico exerceu um papel na manutenção da glicemia, visto que os valores iniciais e finais do grupo DT não diferiram significativamente ($P > 0.05$), como ocorreu no grupo DS. Ao final das 4 semanas, o grupo DT exibiu glicemia menor que o grupo DS ($P < 0.05$).

Tabela 1. Efeitos do diabetes e do exercício físico sobre o peso corporal e a glicemia.

	CS	CT	DS	DT
Peso corporal, g				
Inicial	268.13 ± 5.53	273.50 ± 6.67	266.88 ± 4.42	254.50 ± 5.42
Final	275.75 ± 4.55	$334.13 \pm 7.91^{*\$}$	$183.50 \pm 6.93^{*\dagger\$}$	$182.88 \pm 3.65^{*\dagger\$}$
Glicemia, mg/dL				
Inicial	134.38 ± 3.97	146.13 ± 2.88	$418.88 \pm$	$490.63 \pm 21.40^{*\dagger}$
Final	145.25 ± 6.59	160.25 ± 7.36	$654.63 \pm$	$494.38 \pm 2.39^{*\dagger\dagger}$

* $P < 0.05$ vs. CS; † $P < 0.05$ vs. CT; ‡ $P < 0.05$ vs. DS; § $P < 0.05$ vs. valores iniciais do mesmo grupo.

4.2. Mortalidade

No decorrer do período experimental de quatro semanas, os animais do grupo DS apresentaram maior coeficiente de mortalidade (60%, 12 casos em 20 animais) em comparação aos grupos controles (sem óbitos) ($P < 0.05$). O treinamento físico reduziu a mortalidade entre os animais do grupo DT (23,53%, 4 casos em 17 animais), de modo que este foi semelhante aos grupos controles ($P > 0.05$), e diferiu significativamente do grupo DS ($P < 0.05$) (Fig. 5).

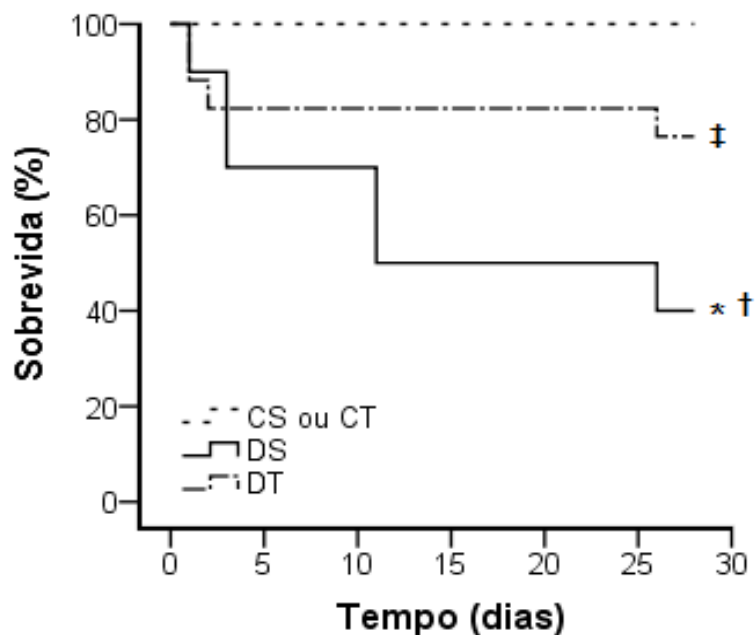


Figura 5. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier para os grupos CS, CT, DS e DT. Não houve óbito nos grupos controles (100% de sobrevivência), estando os mesmos representados no gráfico por uma única linha. * $P < 0.05$ vs. CS; † $P < 0.05$ vs. CT; ‡ $P < 0.05$ vs. DS.

4.3. Morfologia do Ventrículo Esquerdo

4.3.1. Espessura da Parede Ventricular

A figura 6A representa os efeitos do diabetes e do treinamento físico sobre a espessura da parede do VE. Encontrou-se aumento da espessura da parede ventricular no grupo CT, quando comparado ao grupo CS ($P < 0.05$). Ainda, foi visto que o diabetes, isoladamente, não causou quaisquer alterações ($P > 0.05$), ao passo que, combinado ao treinamento físico, resultou em diminuição da espessura ventricular ($P < 0.05$) (Fig. 6B).

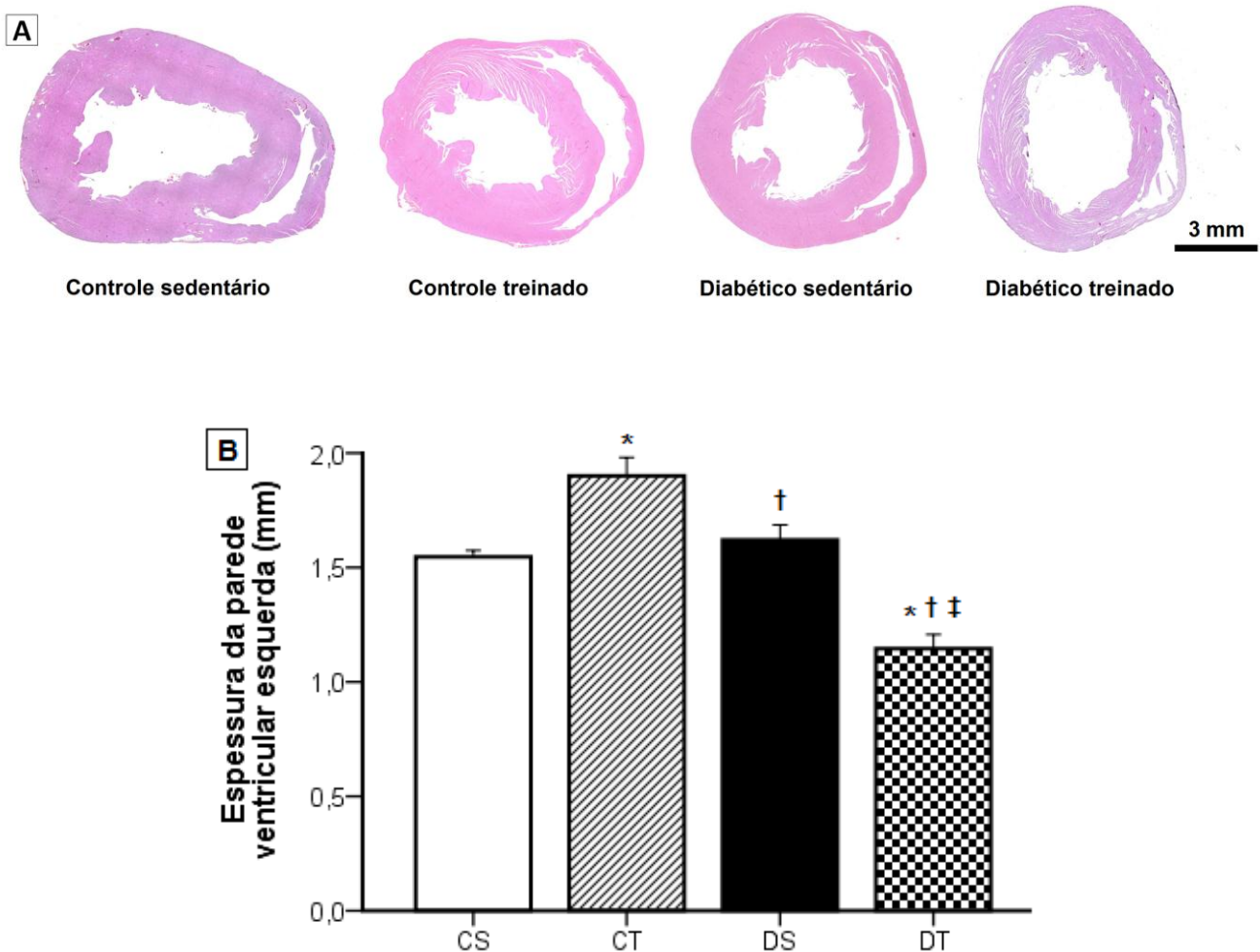


Figura 6. Efeitos do diabetes e do exercício na espessura da parede ventricular esquerda. Fotomicrografias representativas dos grupos CS, CT, DS e DT (A). Quantificação da espessura da parede ventricular esquerda e comparação entre os grupos experimentais (B). Técnica de coloração: HE; Barra de escala: 3 μ m. * $P < 0.05$ vs. CS; † $P < 0.05$ vs. CT; ‡ $P < 0.05$ vs. DS.

4.3.2. Diâmetro dos Cardiomiócitos

A figura 7A mostra fotomicrografias representativas de secções do VE, usadas para avaliação do diâmetro dos miócitos cardíacos. O grupo CT exibiu maior diâmetro dos miócitos, em comparação ao grupo CS ($P < 0.05$). De modo semelhante ao que foi visto na avaliação da espessura da parede ventricular, o grupo DS não diferiu do grupo CS em suas medidas ($P > 0.05$). O grupo DT, por sua vez, apresentou miócitos com menor diâmetro, quando comparado aos demais grupos ($P < 0.05$) (Fig. 7B).

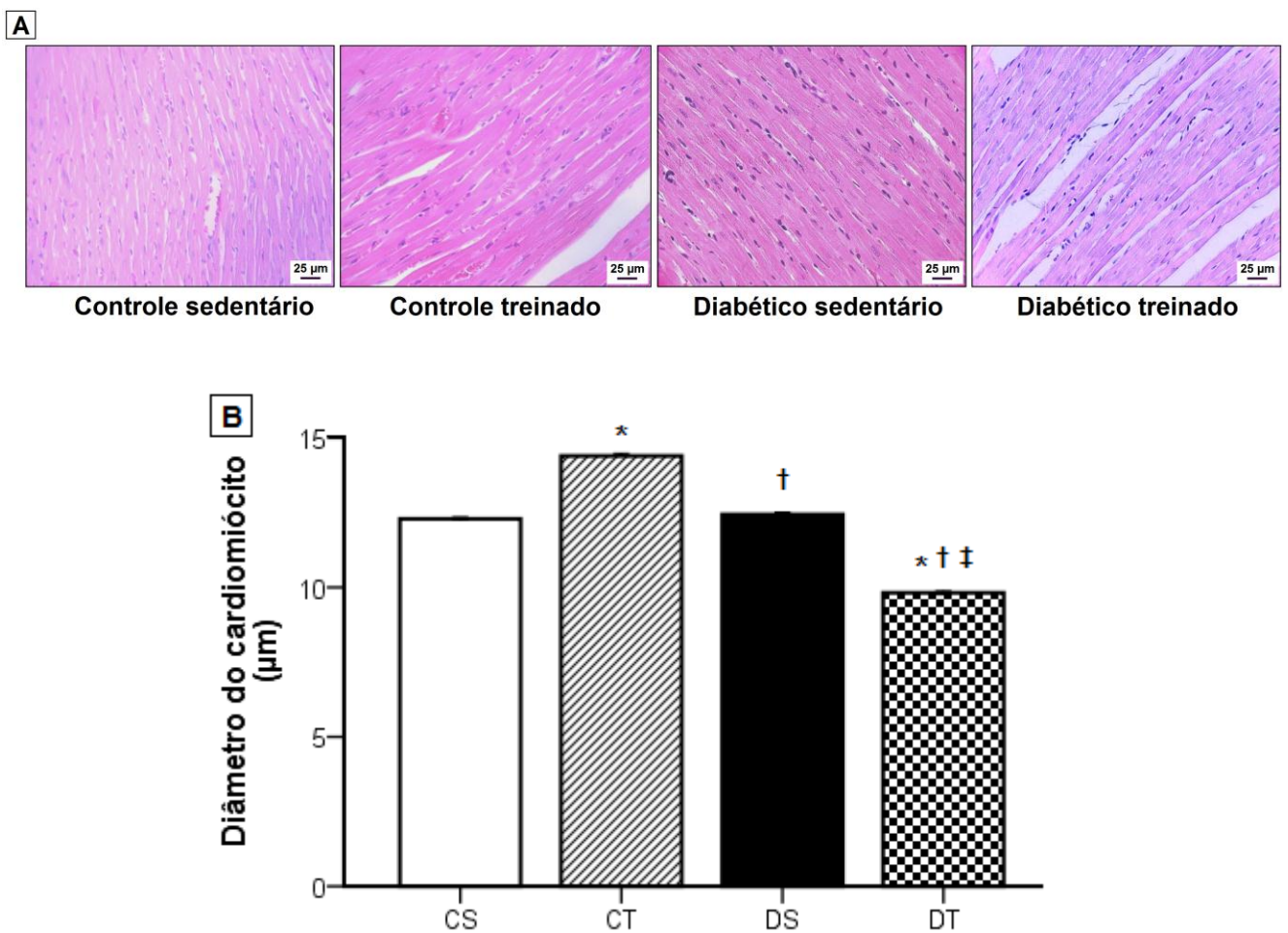


Figura 7. Efeitos do diabetes e do exercício no diâmetro dos cardiomiócitos. Fotomicrografias representativas dos grupos CS, CT, DS e DT **(A)**. Quantificação do diâmetro dos miócitos cardíacos e comparação entre os grupos experimentais **(B)**. Técnica de coloração: HE; Barra de escala: 25 µm. * $P < 0.05$ vs. CS; † $P < 0.05$ vs. CT; ‡ $P < 0.05$ vs. DS.

4.3.3. Área de Secção Transversa dos Cardiomiócitos

A figura 8A mostra fotomicrografias representativas de secções do VE, usadas para avaliação da AST dos cardiomiócitos. Maiores medidas de AST foram observadas no grupo CT, em comparação ao grupo CS ($P < 0.05$). De maneira distinta do padrão de alterações morfológicas visto até aqui, o grupo DS exibiu miócitos com maior AST do que o grupo CS ($P < 0.05$). O grupo DT apresentou miócitos com menor AST, quando comparado aos demais grupos experimentais ($P < 0.05$) (Fig. 8B).

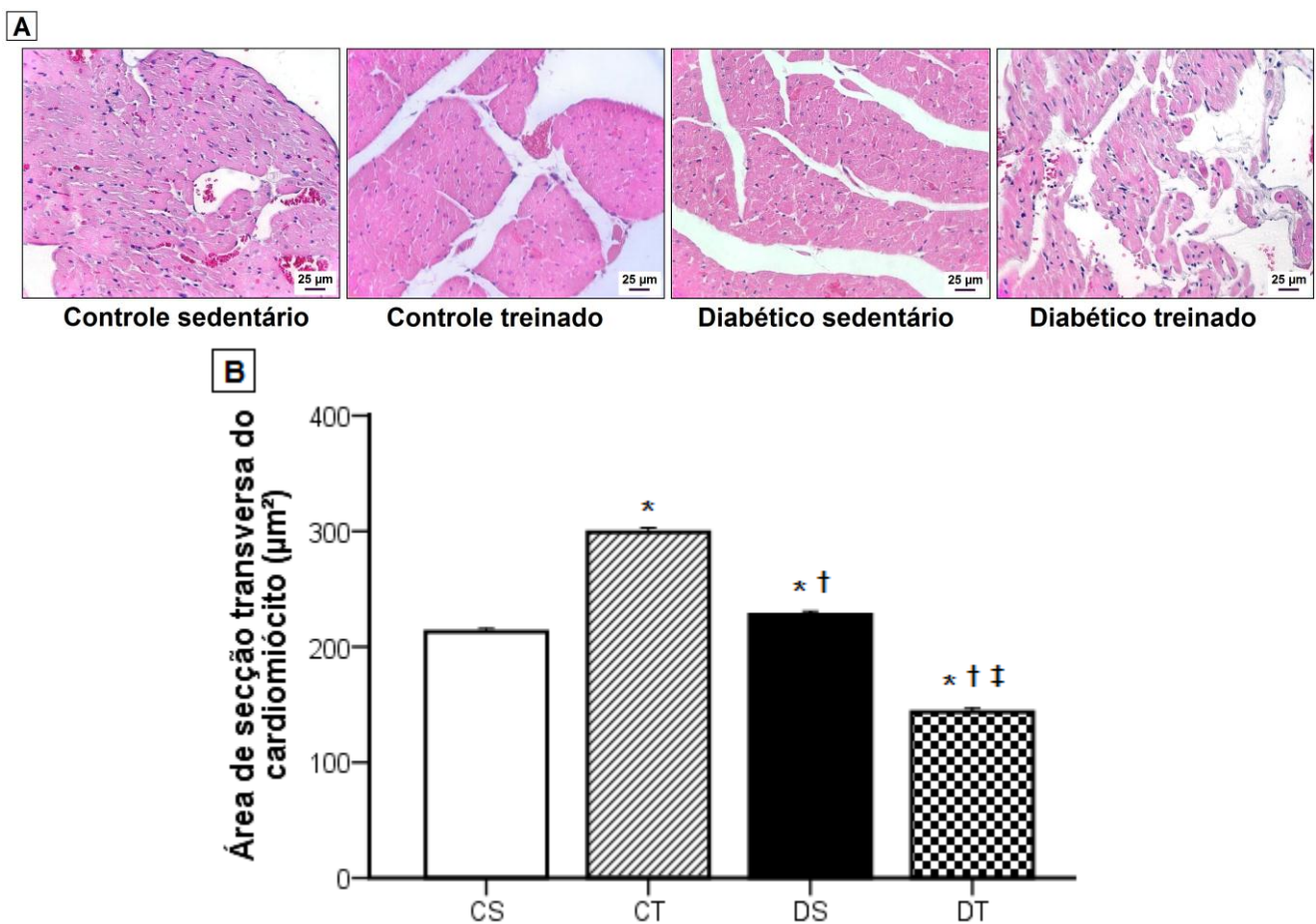


Figura 8. Efeitos do diabetes e do exercício sobre a AST dos cardiomiócitos. Fotomicrografias representativas dos grupos CS, CT, DS e DT **(A)**. Quantificação da AST dos miócitos cardíacos e comparação entre os grupos experimentais **(B)**. Técnica de coloração: HE; Barra de escala: 25 µm. * $P < 0.05$ vs. CS; † $P < 0.05$ vs. CT; ‡ $P < 0.05$ vs. DS.

4.3.4. Conteúdo Colágeno

A figura 9A mostra fotomicrografias representativas de secções do VE, coradas com *picrosirius red*, usadas para análise do conteúdo colágeno total. Quando comparados ao grupo CS, O grupo CT apresentou menor conteúdo colágeno depositado em sua MEC ($P < 0.05$), enquanto um maior conteúdo fibrótico foi verificado no grupo DS ($P < 0.05$). O grupo DT, apesar de não diferir significativamente do grupo DS, exibiu conteúdo colágeno total em nível similar ao grupo CS ($P > 0.05$) (Fig. 9B).

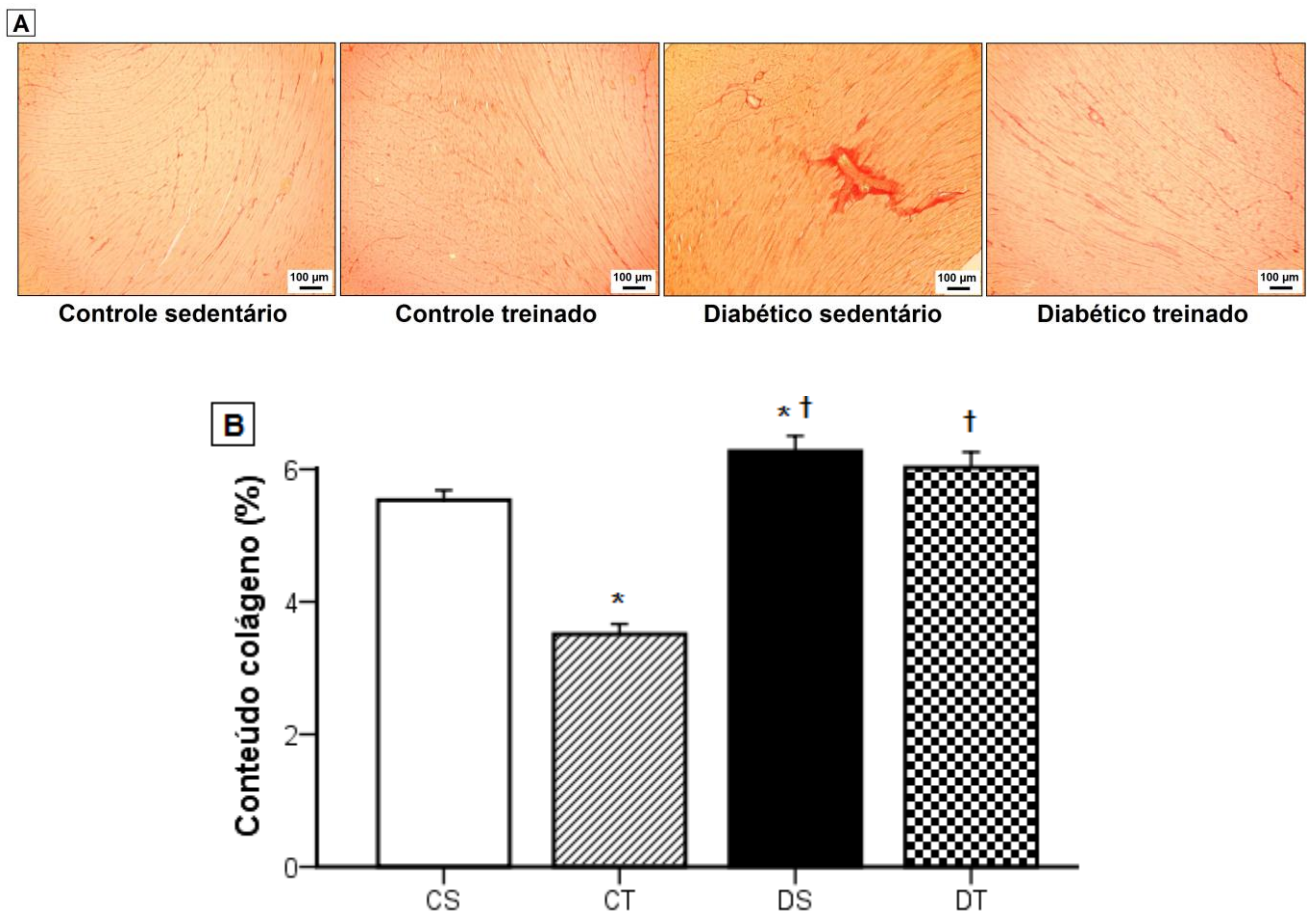


Figura 9. Efeitos do diabetes e do exercício no conteúdo colágeno. Fotomicrografias representativas dos grupos CS, CT, DS e DT (A). Quantificação do conteúdo colágeno total, presente na MEC ventricular esquerda, e comparação entre os grupos experimentais (B). Técnica de coloração: *picrosirius red*; Barra de escala: 100 µm. * $P < 0.05$ vs. CS; † $P < 0.05$ vs. CT; ‡ $P < 0.05$ vs. DS.

4.4. Expressão Gênica dos Colágenos I e III, das MMPs 2 e 9, e do TGF- β 1

Os níveis de mRNA dos genes do colágeno tipo I e do colágeno tipo III apresentaram-se inalterados no grupo CT ($P > 0.05$), enquanto foram hipoexpressos nos grupos DS e DT ($P < 0.05$) (Figs. 10A e B). A expressão para a MMP-2 mostrou-se aumentada no grupo CT ($P < 0.05$) e diminuída no grupo DS ($P < 0.05$), ao passo que o grupo DT apresentou expressão similar ao grupo CS ($P > 0.05$) (Fig. 10C). Exibindo um padrão oposto, a MMP-9 foi expressa em nível significativamente diferente do grupo CS apenas no grupo DT, com baixa expressão ($P < 0.05$) (Fig. 10D). Na figura 10E, observa-se a expressão gênica do TGF- β 1, que chama a atenção apenas por sua hiperexpressão no grupo CT ($P < 0.05$). A razão entre expressão gênica dos tipos colágenos I e III apresentou-se aumentada no grupo CT ($P < 0.05$) e reduzida nos grupos diabéticos ($P < 0.05$) (Fig. 10F). A tabela 2 resume o perfil de regulação dos genes estudados, caracterizando as diferenças (CT, DS e DT comparados ao CS) como porcentagem.

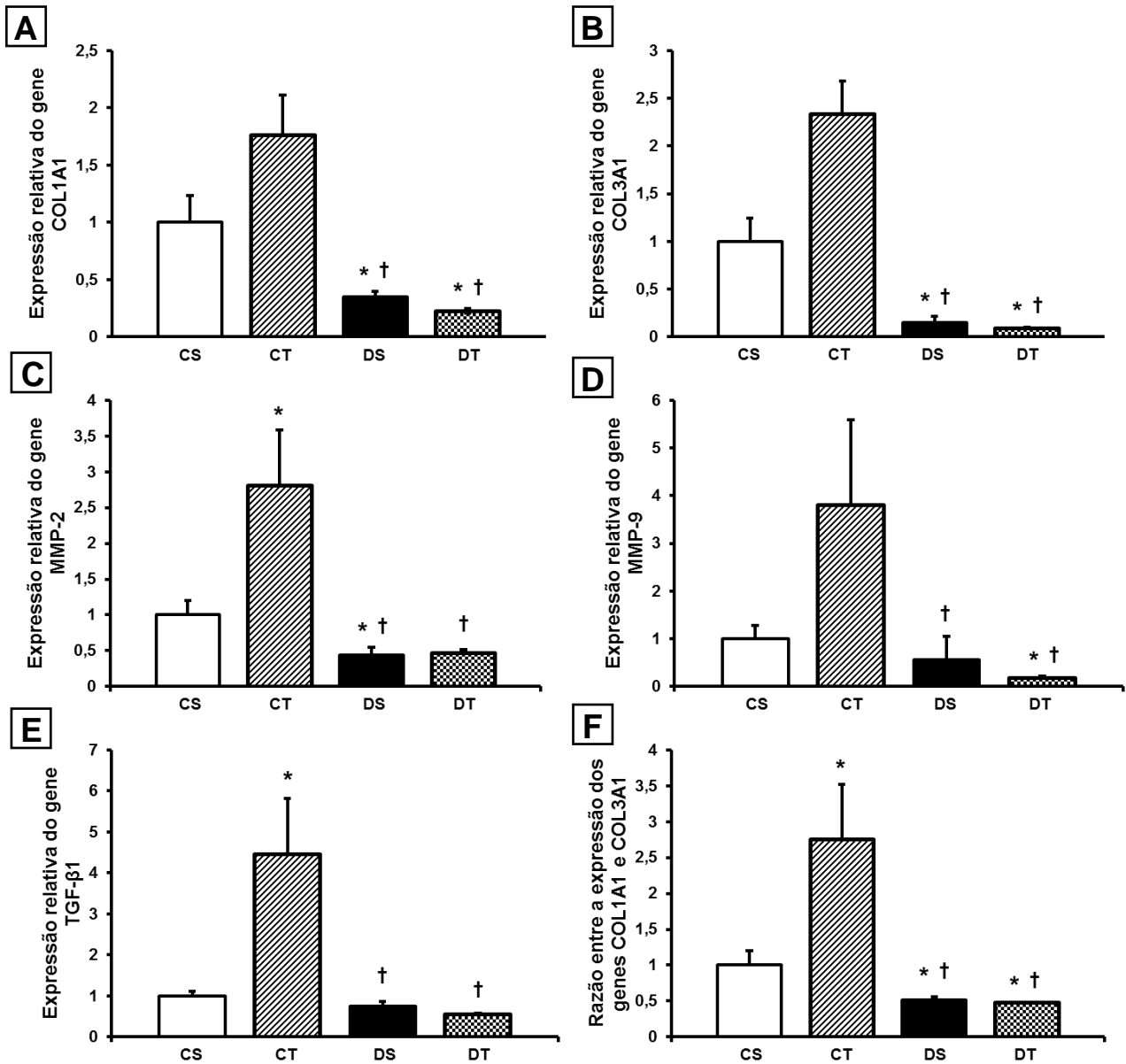


Figura 10. Expressão de genes envolvidos no remodelamento da MEC do VE diabético. Os níveis de mRNA dos genes alvo nos grupos CT, DS e DT estão representados como alterações em número de vezes em relação ao grupo CS (com valor igual a 1). Expressão relativa de mRNA nos grupos CS, CT, DS e DT para: colágeno tipo I (COL1A1) = 1, 1.76, 0,35 e 0.23, respectivamente **(A)**; colágeno tipo III (COL3A1) = 1, 2.34, 0.15 e 0.09, respectivamente **(B)**; metaloprotease 2 (MMP-2) = 1, 2.81, 0.44 e 0.46, respectivamente **(C)**; metaloprotease 9 (MMP-9) = 1, 3.80, 0.56 e 0.17, respectivamente **(D)**; fator de crescimento transformador-β1 (TGF-β1) = 1, 4.45, 0.75 e 0.55, respectivamente **(E)**; razão entre expressão gênica dos colágenos tipo I e III (COL1A1 / COL3A1) = 1, 2.76, 0.52 e 0.48, respectivamente. * $P < 0.05$ vs. CS; † $P < 0.05$ vs. CT; ‡ $P < 0.05$ vs. DS.

Tabela 2. Resumo do perfil de expressão dos genes alvo.

	Grupos experimentais comparados ao grupo CS		
	CT	DS	DT
Colágeno tipo I	176%	(↓) 286%*	(↓) 435%*
Colágeno tipo III	234%	(↓) 666%*	(↓) 1111%
MMP-2	(↑) 281%*	(↓) 227%*	217%
MMP-9	380%	179%	(↓) 588%*
TGF-β1	(↑) 445%*	133%	182%
Colágeno I/III	(↑) 276%*	(↓) 192%*	(↓) 208%*

Os dados estão expressos como porcentagem do incremento (↑) ou diminuição (↓) na regulação gênica em relação aos valores do grupo CS.

* $P < 0.05$ vs. CS

5. DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstraram que o diabetes experimental comprometeu a sobrevivência dos animais, enquanto, claramente, levou a perturbações na estrutura e expressão gênica da MEC, as quais estabelecem um dano direto e precoce ao VE diabético. Ainda, verificamos que o treinamento aeróbio exerceu um papel benéfico, embora modesto, na proteção contra o remodelamento do interstício cardíaco, e na atenuação da mortalidade sobre os animais doentes. Até onde temos ciência, este foi o primeiro estudo que avaliou o remodelamento cardíaco adverso em modelo experimental de DM1 de curto prazo, além do papel do treinamento aeróbio nessas condições.

De acordo com os objetivos a que se propôs, o presente trabalho utilizou um breve período (4 semanas) no qual os animais estiveram doentes, caracterizando-o como de curto prazo (He *et al.*, 2013). Por outro lado, tendo em vista as publicações relacionadas, é apropriado afirmar que nosso modelo experimental de DM1 consistiu numa condição crônica sobre os animais (Cagalinec *et al.*, 2013; Seccia *et al.*, 2003). Enquanto tal, o diabetes induzido por STZ tem sido cada vez mais citado na literatura como um modelo experimental de CMD (Westermann *et al.*, 2007; Castellar *et al.*, 2011; He *et al.*, 2013), sendo particularmente útil na avaliação dos efeitos causados unicamente pela hiperglicemia (Poornima *et al.*, 2006).

Como era esperado, devido a sua condição, os animais diabéticos sofreram perda de peso corporal significativa, associada a sinais, qualitativamente observados, de poliúria, polifagia e polidipsia. A esse quadro, somam-se os altos índices glicêmicos observados após 48h da administração de STZ nos grupos DS e DT, que confirmaram a eficácia do modelo de DM1 aqui empregado. Apesar de ambos os grupos exibirem hiperglicemia igualmente severa no início do período experimental, a mesma cursou com aumento no grupo DS, mas se manteve estável no grupo DT, ao longo do estudo. Como resultado, o grupo DT apresentou redução da glicemia após 4 semanas, se comparado ao grupo DS. Acredita-se que, mesmo pequena, a redução da glicemia causada pelo exercício seja suficiente para evitar, em certo grau, alterações morfológicas do miocárdio causadas pela hiperglicemia (Castellar *et al.*, 2011). O aumento do estresse oxidativo e o acionamento de vias que sinalizam para distúrbios celulares e da MEC são exemplos de consequências do estado hiperglicêmico (Aneja *et al.*, 2008).

O regime de treinamento utilizado neste estudo consistiu em sessões de corrida em esteira, com 60 minutos/dia, 5 dias/semana, durante 4 semanas, numa

velocidade de 13 m/min. Na área da fisiologia do exercício, geralmente utiliza-se o consumo de oxigênio (VO_2) como uma porcentagem do consumo máximo de oxigênio ($VO_{2\text{ max}}$) para caracterizar ou prescrever uma intensidade de treinamento (Howarth *et al.*, 2010; Rodrigues *et al.*, 2007; De Angelis *et al.*, 2000). Em nosso estudo, não houve a monitoração de tais medidas. Entretanto, Rorigues e colegas (2007), demonstraram forte correlação entre a velocidade de corrida em esteira e o VO_2 , em ratos controles e diabéticos. Ainda foi visto que, para velocidades entre 3 e 19 m/min, o VO_2 aumenta progressivamente em função da velocidade, de tal modo que a relação entre ambos pode ser expressa por uma equação linear (Rodrigues *et al.*, 2007). De acordo com esses achados, a velocidade que utilizamos (13 m/min) corresponderia a um VO_2 equivalente a cerca de 80% do $VO_{2\text{ max}}$ para o animal controle, e 90% do $VO_{2\text{ max}}$ para o animal diabético. Os próprios autores, contudo, alertam para a possibilidade de superestimação da intensidade através dessa abordagem, isoladamente, uma vez que a frequência cardíaca alcança seu limite em intensidades acima do $VO_{2\text{ max}}$ (Rodrigues *et al.*, 2007). Portanto, parece-nos razoável considerar que o regime de treinamento utilizado em nosso estudo foi comparável ao de estudos prévios, nos quais foram demonstrados efeitos benéficos do exercício no sistema cardiovascular (Fenning *et al.*, 2003; Chakraphan *et al.*, 2005; Jorge *et al.*, 2012).

Sabe-se que pacientes diabéticos apresentam uma alta incidência de eventos cardiovasculares fatais, dentre os quais a morte de origem cardíaca é predominante (Rodrigues *et al.*, 2013). Ao analisarmos a mortalidade entre os grupos de estudo, verificamos que o grupo DT sofreu menor taxa de mortalidade em comparação ao grupo DS. Como visto nos resultados, o treinamento aeróbio foi capaz de atenuar certas alterações causadas pelo DM1. Possivelmente, essas adaptações positivas contribuíram para o incremento da sobrevivência dos animais do grupo DT sobre o grupo DS. Porém, os mecanismos exatos pelos quais o treinamento aeróbio causa a redução da mortalidade em pacientes diabéticos não estão completamente esclarecidos.

As alterações morfológicas, observadas precocemente no grupo DS, incluem aumento da AST dos miócitos e do conteúdo colágeno. A espessura da parede do VE e o diâmetro dos miócitos não foram alterados pelo DM1, isoladamente. A hipertrofia do miócito é um achado típico na cardiomiopatia induzida pelo diabetes

do tipo 2. Nos modelos de diabetes induzido por STZ, devido a hipoinsulinemia, a hipertrofia cardíaca é uma alteração menos comum (Poornima *et al.*, 2006).

Curiosamente, o grupo DT apresentou hipotrofia marcante, tanto em nível de parede ventricular como em nível celular. Esse quadro morfológico encontra maior semelhança com a descrição do fenótipo cardíaco observado no DM1, isto é, dilatação e remodelamento excêntrico do VE, com adelgaçamento da parede ventricular e seus miócitos (Rosa *et al.*, 2013; Bilim *et al.*, 2008). Embora pouco compreendidos, acredita-se que os mecanismos pelos quais o DM1 leva à hipotrofia cardíaca envolvem a privação calórica associada ao distúrbio metabólico, e a substituição da glicose pelos ácidos graxos livres como substrato para a produção de energia (Poornima *et al.*, 2006; Bilim *et al.*, 2008). Assim, os dois padrões de trofismo distintos, entre os grupos DS e DT, sugerem que o prazo de 4 semanas pode ter sido suficiente apenas para causar discretas mudanças no tamanho celular do grupo DS, enquanto que o treinamento aeróbio pode ter sido intenso ao ponto de acentuar os efeitos metabólicos do DM1.

Vale salientar que o grupo CT apresentou hipertrofia concêntrica do VE, uma adaptação fisiológica que não acompanha redução da câmara ventricular ou disfunção, comum em atletas (Barauna *et al.*, 2007). Isso nos faz considerar que o treinamento nos animais diabéticos teve o seu efeito benéfico sobre o trofismo cardíaco subjugado pela severa condição dos animais. Apesar das aparentes inconsistências sobre os benefícios do exercício no estado diabético severo, em geral, não existem evidências que liguem o treinamento aeróbio à piora das condições clínicas associadas ao diabetes (Saraceni & Broderick, 2007). As únicas exceções referem-se a pacientes diabéticos com neuropatia autonômica cardíaca e ratos com DM1 treinados acima de 90% do $VO_{2\ max}$ (Kahn *et al.*, 1986; Goodyear *et al.*, 1988). Como discutido anteriormente, é possível que, para um mesmo regime de treinamento, animais controles e diabéticos tenham experimentado esforço físico diferente (Rodrigues *et al.*, 2007). Dessa maneira, é possível que os achados relacionados ao trofismo cardíaco do grupo DT se devam, ao menos em parte, a uma capacidade cardiorrespiratória gravemente debilitada frente à alta instensidade de treinamento (Lahaye *et al.*, 2010).

Em relação à quantificação de fibrose no VE, encontramos um aumento na porcentagem de colágeno total do grupo DS. Esse achado evidencia, claramente, o remodelamento adverso e precoce pelo qual passa o VE diabético. A fibrose

cardíaca é tida como um forte determinante da hipertrofia patológica (Brilla, 2000), e, com sua progressão, resulta em complacência cardíaca reduzida, com acometimento sistólico e diastólico (Poornima *et al.*, 2006). A hiperglicemia, por sua vez, é considerada como o fator central no desencadeamento dos processos patológicos de hipertrofia e fibrose (Aneja *et al.*, 2008), ausentes no grupo DT. Com esse ponto em destaque, compreende-se que a redução da glicemia verificada no grupo DT pode ter atenuado os efeitos negativos do estresse oxidativo e de outras vias metabólicas que deflagram a deposição de colágeno (Castellar *et al.*, 2011).

De maneira mais acentuada (embora meramente aparente), o grupo CT exibiu uma redução da fração de colágeno total. A ênfase a esse achado não se deve à verificação de uma alteração morfológica propriamente, mas se baseia no viés metodológico apontado por Linehan e colegas (2001). Ocorre que, em um coração hipertrofiado, os miócitos ocupam uma grande área em relação aos outros constituintes teciduais. Isso significa que mesmo quando a deposição colágena aumenta, poderá haver uma menor fração de colágeno por unidade de área tecidual em corações hipertrofiados, comparados com controles (Linehan *et al.*, 2001). Assim, voltando-se o foco para os grupos diabéticos, ressaltamos que tal viés metodológico confirma os achados relacionados à quantificação de colágeno. Isto é, o grupo DS, que exibiu leve hipertrofia dos miócitos, apresentou deposição colágena excessiva, enquanto no grupo DT, com hipotrofia celular, observou-se conteúdo colágeno semelhante ao grupo CS.

Nosso grupo ainda realizou análises de expressão gênica nas amostras cardíacas, com o intuito de verificar possíveis perturbações do DM1 no remodelamento da MEC e um papel do exercício sobre as mesmas. O remodelamento da MEC compreende os processos de síntese e degradação de proteínas, além de ativação e diferenciação celular (Khan & Sheppard, 2006). Os genes alvo deste estudo são amplamente aceitos como peças fundamentais nesses processos (Candido *et al.*, 2003; Daniels *et al.*, 2012).

É interessante notar que, no VE do grupo DS, o aumento do conteúdo colágeno foi associado a uma redução na expressão dos colágenos I e III, além de baixa expressão da MMP-2. Tais resultados sugerem que distúrbios nas taxas de degradação do colágeno, mais que um aumento em sua produção, são proeminentes no desenvolvimento da fibrose cardíaca no DM1 (Van Linthout *et al.*, 2008). O colágeno é uma proteína que naturalmente possui baixos índices de

renovação, o que pode ser acentuado pela hiperglicemia. Nestas condições, os resíduos de lisina do colágeno sofrem glicação, tornando esta proteína ainda mais estável (Fang *et al.*, 2004). A degradação do colágeno, por sua vez, é governada por sua estabilidade e pela atividade de proteases da MEC, como as MMPs 2 e 9, conhecidamente envolvidas no remodelamento do miocárdio (Spinale, 2007). No contexto da CMD, foi previamente demonstrado que a fibrose cardíaca acompanhou uma diminuição na expressão gênica da MMP-2 (Van Linthout *et al.*, 2008; Daniels *et al.*, 2012), enquanto a expressão da MMP-9 se mostrou inalterada (Bollano *et al.*, 2007) ou elevada (Daniels *et al.*, 2012). Em estudos prévios, encontramos resultados equivalentes aos nossos a respeito da hipoexpressão de colágeno, apesar da fibrose cardíaca (Song *et al.*, 2009; Stefanon *et al.*, 2013). Sabe-se que a produção de colágeno ventricular é resultado da ação dos fibroblastos presentes na MEC (Aneja *et al.*, 2008). Por outro lado, as funções dos fibroblastos cardíacos não se limitam à síntese colágena. Os mesmos são capazes de interagir com vários outros tipos celulares, especialmente os cardiomiócitos. Essa interação ocorre diretamente, por contato físico, ou indiretamente, via fatores parácrinos (Takeda & Manabe, 2011). Entretanto, quando o conteúdo colágeno é excessivo, forma-se uma malha fibrótica capaz de aprisionar os cardiomiócitos. Nestas condições, os miócitos isolados pelo colágeno enfrentam aumento nas distâncias para difusão do oxigênio e outras substâncias (Sabbah *et al.*, 1995). Em estudo *in vitro*, Pathak e colegas (2001) mostraram que a expressão de colágeno em fibroblastos cocultivados com miócitos foi superior ao nível transcricional de colágeno em fibroblastos cultivados isoladamente. Com base na relação de interdependência entre esses dois tipos celulares, entende-se que fatores produzidos pelos miócitos são necessários para que os fibroblastos expressem os genes colágenos (Pathak *et al.*, 2001). A partir dessa perspectiva, pode-se concluir que o acúmulo de colágeno glicado, altamente estável, no grupo DS resultou no comprometimento da comunicação entre miócitos e fibroblastos, o que explicaria seu baixo nível transcricional para os colágenos I e III após 4 semanas. Por outro lado, de acordo com Van Linthout e colegas (2008), o acúmulo de colágeno no miocárdio pode causar supressão da expressão de mRNA para os colágenos tipos I e III, como mecanismo de *feedback* negativo (Van Linthout *et al.*, 2008).

O treinamento aeróbio exerceu um efeito protetor contra certas alterações sobre o perfil transcricional do VE, causadas pelo DM1. Em geral, o perfil de

expressão gênica do grupo DT foi bastante próximo ao perfil dos animais diabéticos sem treinamento. Contudo, as modestas diferenças que exibiu frente ao grupo DS, segundo o que foi discutido, refletem efeitos precisamente direcionados sobre os mecanismos causadores do dano ao interstício cardíaco. Especificamente, o grupo DT apresentou diminuição dos níveis de mRNA para MMP-9, e expressão gênica de MMP-2 inalterada, se comparado ao grupo CS. Dessa maneira, o exercício foi capaz de favorecer a renovação da MEC e, assim, contribuir para a manutenção do conteúdo colágeno em níveis normais, como visto na avaliação morfológica desse grupo.

Além de sintetizar proteínas da MEC e MMPs (Takeda & Manabe, 2011), o fibroblasto cardíaco é a principal fonte de TGF- β 1 (Khan & Sheppard, 2006), uma citocina multifuncional que contribui para a produção de colágeno e hipertrofia dos cardiomiócitos (Takeda & Manabe, 2011). O TGF- β 1, por sua vez, promove a diferenciação dos fibroblastos cardíacos em miofibroblastos, um tipo ainda mais ativo de célula do tecido conjuntivo. Dessa maneira, o TGF- β 1 é capaz de induzir sua própria produção e aumentar a deposição de colágeno (Lijnen & Petrov, 2002). Por conseguinte, uma vez que resulta na fibrose cardíaca, a hiperexpressão do TGF- β 1 é comumente citada na literatura como um achado prejudicial (Khan & Sheppard, 2006).

No entanto, verificamos que essa citocina apresentou aumento em seu nível de mRNA somente no grupo CT, que não cursou com fibrose. De modo semelhante, Calderone e colegas (2001) observaram uma alta expressão do TGF- β 1 no VE em modelo animal de hipertrofia cardíaca fisiológica, induzida pelo exercício (Calderone *et al.*, 2001). Por outro lado, vimos que a MMP-2 também foi hiperexpressa no grupo CT. Evidências indicam que os papéis do TGF- β 1 e da MMP-2 no remodelamento cardíaco podem estar interligados (Khan & Sheppard, 2006). Sugere-se que o TGF- β 1 aumenta a atividade e a expressão gênica da MMP-2 no miocárdio (Overall *et al.*, 1991). Dessa maneira, é plausível admitir que o miocárdio de um organismo saudável e submetido à sobrecarga é exposto aos efeitos benéficos da ação conjunta do TGF- β 1 e da MMP-2. Em outras palavras, o mesmo adapta-se com síntese de proteínas contráteis e da MEC, sem o detrimento da deposição colágena excessiva. Esses resultados indicam que a sinalização do TGF- β 1 pode representar uma adaptação essencial do miocárdio sob estresse mecânico (Takeda & Manabe,

2011). Além desses efeitos, observamos aumento na razão entre a expressão gênica dos tipos colágenos avaliados (razão colágeno I/III) do grupo CT. Significa dizer o predomínio natural do colágeno tipo I sobre o tipo III foi acentuado pelo treinamento aeróbio, em nível transcricional. Visto que o colágeno tipo I fornece importante resistência tênsil (Pauschinger *et al.*, 1999), isso pode ter contribuído com a função do músculo cardíaco do grupo CT.

A esse respeito, vimos que a razão colágeno I/III foi reduzida no VE dos grupos diabéticos. Aparentemente, tal alteração resultou de graus distintos na redução entre a expressão gênica de ambos os tipos colágenos, com favorecimento ao tipo III. As isoformas I e III constituem os dois principais tipos colágenos presentes no miocárdio, em condições normais ou patológicas (Pathak *et al.*, 2001). O colágeno tipo I é uma fibra espessa e confere rigidez aos tecidos, enquanto o colágeno tipo III, com diâmetro relativamente menor, caracteriza-se por sua complacência (Brower *et al.*, 2006). Assim, não somente a quantidade, mas também a qualidade do colágeno é importante na definição da patofisiologia da CMD (Pauschinger *et al.*, 1999). Tanto em modelos experimentais como em pacientes diabéticos, verificou-se uma razão colágeno I/III inferior, comparada a um grupo controle sem diabetes (Shimizu *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 2003). Embora o significado funcional desse tipo de alteração ainda não tenha sido completamente determinado (Brower *et al.*, 2006), resultados prévios demonstraram correlação inversa ($r = -0.91$) entre a função ventricular e a proporção do colágeno tipo III sobre o tipo I (Burgess *et al.*, 1996). Desse modo, ao passo que leva ao acúmulo colágeno e consequente aumento na rigidez do VE (Brower *et al.*, 2006), o DM1 também diminui o predomínio do colágeno tipo I sobre o tipo III, resultando em perda de suporte aos miócitos e dilatação ventricular (Spinale, 2007).

Coletivamente, os resultados apresentados neste estudo alertam para os sérios danos precoces aos quais pacientes com DM1 estão expostos. Como discutido anteriormente, essas rápidas manifestações são determinantes no surgimento da disfunção ventricular esquerda. Contudo, no estudo de Konduracka e colegas (2007), que empregou técnicas bioquímicas, morfológicas e ecocardiografia, não foram verificadas alterações estruturais ou disfunção cardíaca em pacientes com DM1. Esse trabalho, então, serviu de base para argumentos a respeito das limitações dos modelos experimentais de CMD diante do cenário clínico (Khavandi *et al.*, 2009). Porém, conquanto se argumente nesse sentido, destacamos que os

próprios autores do estudo mencionado admitem que todos os pacientes eram intensivamente tratados com insulina (Konduracka *et al.*, 2007). Na realidade, atualmente é reconhecido que o diabetes alcançou um caráter epidêmico ao redor do mundo, atingindo territórios de todos os níveis econômicos. Além disso, cerca de 50% dos sujeitos diabéticos desconhecem que estão doentes (International Diabetes Federation, 2012). Portanto, a ideia de que, em muitos casos, o DM1 danifica o coração e outros órgãos antes que o paciente inicie um tratamento adequado parece mais plausível.

Finalmente, estes resultados também sugerem que o treinamento aeróbio exerce proteção contra alguns dos mecanismos responsáveis pelo dano cardíaco observado no DM1, mesmo num estado descompensado da doença.

6. CONCLUSÕES

Em suma, nossos resultados suportam a ideia de que o remodelamento adverso do VE diabético manifesta-se dentro de um prazo mais curto do que já se havia evidenciado. Sinais precoces de dano à estrutura, bem como ao perfil de expressão gênica da MEC cardíaca foram claramente demonstrados. Ressaltamos, ainda, um papel específico do treinamento aeróbio na proteção do VE contra mecanismos causadores de tais danos. Embora limitada, essa proteção foi associada com a preservação da sobrevivência nos ratos com DM1. Possivelmente, os efeitos benéficos do exercício físico sobre o coração diabético sejam mais relevantes num contexto menos severo, quando aliado à insulino-terapia e à dieta adequada. Dessa maneira, estudos com delineamento específico são necessários para testar essas possibilidades.

7. REFERÊNCIAS

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**. 37 Suppl 1: S81-90, 2014.

ANEJA A, TANG WHW, BANSILAL S, GARCIA MJ, FARKOUH ME. Diabetic cardiomyopathy: insights into pathogenesis, diagnostic challenges, and therapeutic options. **Am. J. Med.** 121 (9): 457–478, 2008.

ARAGNO M, MASTROCOLA R, ALLOATTI G, VERCELLINATTO I, BARDINI P, GEUNA S, CATALANO MG, DANNI O, BOCCUZZI G. Oxidative stress triggers cardiac fibrosis in the heart of diabetic rats. **Endocrinology**. 149: 380–388, 2008.

ARES-CARRASCO S, PICATOSTE B, BENITO-MARTÍN A, ZUBIRI I, SANZ AB, SÁNCHEZ-NIÑO MD, ORTIZ A, EGIDO J, TUÑÓN J, LORENZO O. Myocardial fibrosis and apoptosis, but not inflammation, are present in long-term experimental diabetes. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 297(6): H2109-19, 2009.

ARONSON D. Cross-linking of glycated collagen in the pathogenesis of arterial and myocardial stiffening of aging and diabetes. **J Hypertens**. 21:3–12, 2003.

BARAUNA VG, ROSA KT, IRIGOYEN MC, DE OLIVEIRA EM. Effects of resistance training on ventricular function and hypertrophy in a rat model. **Clin Med Res**. 5(2): 114-20, 2007.

BILIM O, TAKEISHI Y, KITAHARA T, ARIMOTO T, NIIZEKI T, SASAKI T, GOTO K, KUBOTA I. Diacylglycerol kinase zeta inhibits myocardial atrophy and restores cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetes mellitus. **Cardiovasc Diabetol**. 7:2, 2008.

BLACK MJ, et al. Chronic type 1 diabetes in spontaneously hypertensive rats leads to exacerbated cardiac fibrosis. **Cardiovasc. Pathol**. 19: 361–370, 2010.

BOLLANO E, OMEROVIC E, SVENSSON H, WAAGSTEIN F, FU M. Cardiac remodeling rather than disturbed myocardial energy metabolism is associated with cardiac dysfunction in diabetic rats. **Int J Cardiol**. 14(2): 195-201, 2007.

BOOTH GL, KAPRAL MK, FUNG K, TU JV. Relation between age and cardiovascular disease in men and women with diabetes compared with non-diabetic people: a population-based retrospective cohort study. **Lancet**. 368:29–36, 2006.

BOUDINA S, ABEL ED. Diabetic Cardiomyopathy Revisited. **Circulation**. 115: 3213-23, 2007.

BRILLA CG. Regression of myocardial fibrosis in hypertensive heart disease: diverse effects of various antihypertensive drugs. **Cardiovasc Res**. 46(2): 324-31, 2000.

BRODERICK TL, POIRIER P, GILLIS M. Exercise training restores abnormal myocardial glucose utilization and cardiac function in diabetes. **Diabetes Metab Res Rev**. 21(1): 44–50, 2005.

BURGESS ML, BUGGY J, PRICE RL, ABEL FL, TERRACIO L, SAMAREL AM, BORG TK. Exercise- and hypertension-induced collagen changes are related to left ventricular function in rat hearts. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 270: H151-9, 1996.

BURLEW BS, WEBER KT. Cardiac fibrosis as a cause of diastolic dysfunction. **Herz**. 27: 92–8, 2002.

CAGALINEC M, WACZULÍKOVÁ I, ULIČNÁ O, CHORVAT D Jr. Morphology and contractility of cardiac myocytes in early stages of streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats. **Physiol Res**. 62(5): 489-501, 2013.

CALDERONE A, MURPHY RJ, LAVOIE J, COLOMBO F, BÉLIVEAU L. TGF-beta(1) and prepro-ANP mRNAs are differentially regulated in exercise-induced cardiac hypertrophy. **J Appl Physiol**. 91(2): 771-6, 2001.

CANDIDO R. et al. A breaker of advanced glycation end products attenuates diabetes induced myocardial structural changes. **Circ Res**. 92: 785–792, 2003.

CAPASSO J, PALACKAL T, OLIVETTI G, ANVERSA P. Severe myocardial dysfunction induced by ventricular remodeling in aging rat hearts. **Am J Physiol.** 259: H1086–96, 1990.

CARDINAL JW, ALLAN DJ, CAMERON DP. Differential metabolic accumulation may be the cause of strain differences in sensitivity to streptozotocin-induced β cell death in inbred mice. **Endocrinology.** 139: 2885-289, 1998.

CASTELLAR A, REMEDIO RN, BARBOSA RA, GOMES RJ, CAETANO FH. Collagen and reticular fibers in left ventricular muscle in diabetic rats: Physical exercise prevents its changes? **Tissue Cell.** 43: 24–28, 2011.

CHAKRAPHAN D, SRIDULYAKUL P, THIPAKORN B, BUNNAG S, HUXLEY VH, PATUMRAJ S. Attenuation of endothelial dysfunction by exercise training in STZ-induced diabetic rats. **Clin Hemorheol Microcirc.** 32(3): 217-26, 2005.

COPAJA SOTO M, VALENZUELA R, SALDAÑA A, PAZ OCARANZA M, JALIL JE, VIO C, et al. Early expression of monocyte chemoattractant protein-1 correlates with the onset of isoproterenol-induced cardiac fibrosis in rats with distinct angiotensin-converting enzyme polymorphism. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.** 9: 154–162, 2008.

DANIELS A, LINZ D, VAN BILSEN M, RÜTTEN H, SADOWSKI T, RUF S, JURETSCHKE HP, NEUMANN-HAEFELIN C, MUNTS C, VAN DER VUSSE GJ, et al: Long-term severe diabetes only leads to mild cardiac diastolic dysfunction in Zucker diabetic fatty rats. **Euro J Heart Fail.** 14:193–201, 2012.

DE ANGELIS KL, OLIVEIRA AR, DALL'AGO P, PEIXOTO LR, GADONSKI G, LACCHINI S, FERNANDES TG, IRIGOYEN MC. Effects of exercise training on autonomic and myocardial dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. **Braz J Med Biol Res.** 33(6): 635-41, 2000.

DE ANGELIS K, DA PUREZA DY, FLORES LJ, RODRIGUES B, MELO KF, SCHAAN BD, IRIGOYEN MC. Physiological effects of exercise training in patients

with type 1 diabetes. [Article in Portuguese]. **Arq Bras Endocrinol Metab.** 50 (6): 1005–1013, 2006.

DIEZ J, GONZALEZ A, LOPEZ B, QUEREJETA R. Mechanisms of disease: pathologic structural remodeling is more than adaptive hypertrophy in hypertensive heart disease. **Nat Clin Pract Cardiovasc Med.** 2: 209–16, 2005.

ECKARDT L, et al. Arrhythmias in heart failure: current concepts of mechanisms and therapy. **J Cardiovasc Electrophysiol.** 11: 106–17, 2000.

FANG ZY, PRINS JB, MARWICK TH. Diabetic cardiomyopathy: evidence, mechanisms, and therapeutic implications. **Endocr Rev.** 25(4): 543-67, 2004.

FENNING A, HARRISON G, DWYER D, ROSE'MEYER R, BROWN L. Cardiac adaptation to endurance exercise in rats. **Mol Cell Biochem.** 251(1-2): 51-9, 2003.

GOBATTO CA., MELLO MAR, SIBUYA CY, AZEVEDO JRM, SANTOS LA, KOKUBUN E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comp Biochem Physiol.** 130: 21–27, 2001.

GOMES RJ, CAETANO FC, MELLO MAR, LUCIANO E. Effect of chronic exercise on growth factors in diabetic rats. **J Exerc Physiol.** 8: 16–23, 2005.

GOMES RJ, et al. Growth factors and glucose homeostasis in diabetic rats: effects of exercise training. **Cell Biochem Funct.** 27 (4): 199–204, 2009.

GOODYEAR LJ, HIRSHMAN MF, KNUTSON SM, HORTON ED, HORTON ES. Effect of exercise training on glucose homeostasis in normal and insulin-deficient diabetic rats. **J Appl Physiol.** 65: 844-51, 1988.

HE H, QIAO X, WU S. Carbamylated erythropoietin attenuates cardiomyopathy via PI3K/Akt activation in rats with diabetic cardiomyopathy. **Exp Ther Med.** 6(2): 567-573, 2013.

HORDERN MD, SMITH LM, SHORT L, et al. Use of diastolic tissue velocity and standard parameters to assess treatment response in subclinical myocardial disease. A randomized trial of lifestyle intervention in type 2 diabetes. Poster abstract presented at the proceedings of the **Annual American Heart Association Meeting** at Orlando, Florida, 2007.

HOWARTH FC, ALMUGADDUM FA, QURESHI MA, LJUBISAVLJEVIC M. The effects of heavy long-term exercise on ventricular myocyte shortening and intracellular Ca²⁺ in streptozotocin-induced diabetic rat. **J Diabetes Complications**. 24(4): 278-85, 2010.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas 2012 Update, 5th edn**. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2012. <http://www.idf.org/diabetesatlas> [March 2013].

JORGE L, DA PUREZA DY, DA SILVA DIAS D, CONTI FF, IRIGOYEN MC, DE ANGELIS K. Dynamic aerobic exercise induces baroreflex improvement in diabetic rats. **Exp Diabetes Res**. 2012: 108680.

KAHN JK, ZOLA B, JUNI JE, VINIK AL. Decreased exercise heart rate and blood pressure response in diabetic subjects with cardiac autonomic neuropathy. **Diabetes Care**. 9: 389-94, 1986.

KANNEL WB, HJORTLAND M & CASTELLI WP. Role of diabetes in congestive heart failure: the Framingham study. **Am J Cardiol**. 34(1): 29–34, 1974.

KHAN R, SHEPPARD R. Fibrosis in heart disease: understanding the role of transforming growth factor-beta in cardiomyopathy, valvular disease and arrhythmia. **Immunology**. 118(1): 10-24, 2006.

KHAVANDI K, KHAVANDI A, ASGHAR O, GREENSTEIN A, WITHERS S, HEAGERTY AM, MALIK RA. Diabetic cardiomyopathy-a distinct disease? **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**. 23(3):347–360, 2009.

KONDURACKA E, GACKOWSKI A, ROSTOFF P, et al. Diabetes-specific cardiomyopathy in type 1 diabetes mellitus: no evidence for its occurrence in the era of intensive insulin therapy. **Eur Heart J**. 28: 2465-2471, 2007.

LAHAYE S, et al. Intense exercise training induces adaptation in expression and responsiveness of cardiac b-adrenoceptors in diabetic rats. **Cardiovasc Diabetol**. 9: 72, 2010.

LI Y, MA J, ZHU H, SINGH M, HILL D, GREER PA, ARNOLD JM, ABEL ED, PENG T. Targeted inhibition of calpain reduces myocardial hypertrophy and fibrosis in mouse models of type 1 diabetes. **Diabetes**. 60(11): 2985-94, 2011.

LIJNEN P, PETROV V. Transforming growth factor-beta 1-induced collagen production in cultures of cardiac fibroblasts is the result of the appearance of myofibroblasts. **Methods Find Exp Clin Pharmacol**. 24(6): 333-44, 2002.

LINEHAN KA, SEYMOUR AM, WILLIAMS PE. Semiquantitative analysis of collagen types in the hypertrophied left ventricle. **J Anat**. 198(Pt 1): 83-92, 2001.

LIU J, MASUREKAR MR, VATNER DE, JYOTHIRMAYI GN, REGAN TJ, VATNER SF, MEGGS LG, MALHOTRA A. Glycation end-product cross-link breaker reduces collagen and improves cardiac function in aging diabetic heart. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 285(6): H2587-91, 2003.

LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. **Methods**. 25: 402-408, 2001.

LOGANATHAN R, BILGEN M, AL-HAFEZ B, ZHERO SV, ALENEZY MD, SMIRNOVA IV. Exercise training improves cardiac performance in diabetes: in vivo demonstration with quantitative cine-MRI analyses. **J Appl Physiol**. 102: 665-672, 2007.

MACHADO UF, SCHAAN BD, SERAPHIN PM. Transportadores de Glicose na Síndrome Metabólica. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab**. 50 (2): 177–189, 2006.

MOSTARDA C, ROGOW A, SILVA IC, DE LA FUENTE RN, JORGE L, RODRIGUES B, HEEREN MV, CALDINI EG, DE ANGELIS K, IRIGOYEN MC. Benefits of exercise training in diabetic rats persist after three weeks of detraining. **Auton Neurosci.** 28;145(1-2):11-6, 2009.

NAGASAO J, YOSHIOKA K, AMASAKI H, TSUJIO M, OGAWA M, TANIGUCHI K, MUTOH K. Morphological changes in the rat endocrine pancreas within 12 h of intravenous streptozotocin administration. **Anat Histol Embryol.** 34: 42-7, 2005.

OVERALL CM, WRANA JL, SODEK J. Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-kDa gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor-beta 1 in human fibroblasts. Comparisons with collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase gene expression. **J Biol Chem.** 266(21): 14064-71,1991.

PATHAK M, SARKAR S, VELLAICHAMY E, SEN S. Role of myocytes in myocardial collagen production. **Hypertension.** 37(3): 833-40, 2001.

PAUSCHINGER M, KNOPF D, PETSCHAUER S, DOERNER A, POLLER W, SCHWIMMBECK PL, KÜHL U, SCHULTHEISS HP. Dilated cardiomyopathy is associated with significant changes in collagen type I/III ratio. **Circulation.** 99(21): 2750-6, 1999.

POORNIMA IG, PARIKH P, SHANNON RP. Diabetic cardiomyopathy: the search for a unifying hypothesis. **Circ Res.** 98: 596–605, 2006.

RIZZI E, et al. Tempol inhibits TGF- β and MMPs upregulation and prevents cardiac hypertensive changes. **Int J Cardiol.** 165: 165–173, 2013.

RODRIGUES B, FIGUEROA DM, MOSTARDA CT, HEEREN MV, IRIGOYEN MC, DE ANGELIS K. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. **Cardiovasc Diabetol.** 6:38, 2007.

RODRIGUES B, MOSTARDA CT, JORGE L, BARBOZA CA, GRANS CF, DE ANGELIS K, IRIGOYEN MC. Impact of myocardial infarction on cardiac autonomic function in diabetic rats. **J Diabetes Complications**. 27(1): 16-22, 2013.

ROSA CM, XAVIER NP, HENRIQUE CAMPOS D, FERNANDES AA, CEZAR MD, MARTINEZ PF, CICOGNA AC, GIMENES C, GIMENES R, OKOSHI MP, OKOSHI K. Diabetes mellitus activates fetal gene program and intensifies cardiac remodeling and oxidative stress in aged spontaneously hypertensive rats. **Cardiovasc Diabetol**. 12(1): 152, 2013.

RUBLER S, DLUGASH J, YUCEOGLU YZ, et al. New type of cardiomyopathy associated with diabetic Glomerulosclerosis. **Am J Cardiol**. 595-602, 1972.

SABBAH HN, SHAROV VG, LESCH M, GOLDSTEIN S. Progression of heart failure: a role for interstitial fibrosis. **Mol Cell Biochem**. 147(1-2): 29-34, 1995.

SARACENI C, BRODERICK TL. Cardiac and metabolic consequences of aerobic exercise training in experimental diabetes. **Curr Diabetes Rev**. 3(1):75-84, 2007.

SECCIA TM, BELLONI AS, KREUTZ R, PAUL M, NUSSDORFER GG, PESSINA AC, ROSSI GP. Cardiac fibrosis occurs early and involves endothelin and AT-1 receptors in hypertension due to endogenous angiotensin II. **J Am Coll Cardiol**. 41(4): 666-73, 2003.

SHAO CH, WEHRENS XH, WYATT TA, PARBHU S, ROZANSKI GJ, PATEL KP, BIDASEE KR. Exercise training during diabetes attenuates cardiac ryanodine receptor dysregulation. **J Appl Physiol**. 106(4):1280-92, 2009.

SHIMIZU M, UMEDA K, SUGIHARA N, YOSHIO H, INO H, TAKEDA R, OKADA Y, NAKANISHI I. Collagen remodelling in myocardia of patients with diabetes. **J. Clin. Pathol**. 46(1): 32–36, 1993.

SOEDAMAH-MUTHU SS, FULLER JH, MULNIER HE, et al. High risk of cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes in the U.K.: a cohort study using the general practice research database. **Diabetes Care**. 29:798–804, 2006.

SONG GY, WU YJ, YANG YJ, LI JJ, ZHANG HL, PEI HJ, ZHAO ZY, ZENG ZH, HUI RT. The accelerated post-infarction progression of cardiac remodelling is associated with genetic changes in an untreated streptozotocin-induced diabetic rat model. **Eur J Heart Fail**. 11(10): 911-21, 2009.

SOUZA SB, FLUES K, PAULINI J, MOSTARDA C, RODRIGUES B, SOUZA LE, IRIGOYEN MC, DE ANGELIS K. Role of exercise training in cardiovascular autonomic dysfunction and mortality in diabetic ovariectomized rats. **Hypertension**. 50(4):786-91, 2007.

SPACH MS, BOINEAU JP. Microfibrosis produces electrical load variations due to loss of side-to-side cell connections: a major mechanism of structural heart disease arrhythmias. **Pacing Clin Electrophysiol**. 20:397–413, 1997.

SPINALE FG. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. **Physiol Rev**. 87(4): 1285-342, 2007.

STEFANON I, VALERO-MUÑOZ M, FERNANDES AA, RIBEIRO RF JR, RODRÍGUEZ C, MIANA M, MARTÍNEZ-GONZÁLEZ J, SPALENZA JS, LAHERA V, VASSALLO PF, CACHOFEIRO V. Left and right ventricle late remodeling following myocardial infarction in rats. **PLoS One**. 8(5): e64986, 2013.

TAKEDA N, MANABE I. Cellular Interplay between Cardiomyocytes and Nonmyocytes in Cardiac Remodeling. **Int J Inflamm**. 2011: 535241.

VAN LINTHOUT S, SEELAND U, RIAD A, ECKHARDT O, HOHL M, DHAYAT N, RICHTER U, FISCHER JW, BÖHM M, PAUSCHINGER M, SCHULTHEISS HP, TSCHÖPE C. Reduced MMP-2 activity contributes to cardiac fibrosis in experimental diabetic cardiomyopathy. **Basic Res Cardiol**. 103(4): 319-27, 2008.

VON BIBRA H, HANSEN A, DOUNIS V, et al. Augmented metabolic control improves myocardial diastolic function and perfusion in patients with non-insulin dependent diabetes. **Heart**. 90:1483-1484, 2004.

VON BIBRA H, SIEGMUND T, HANSEN A, et al. Augmentation of myocardial function by improved glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus. **Dtsch Med Wochenschr**. 132:729-734, 2007.

WESTERMANN D, RUTSCHOW S, JÄGER S, LINDERER A, ANKER S, RIAD A, UNGER T, SCHULTHEISS HP, PAUSCHINGER M, TSCHÖPE C. Contributions of inflammation and cardiac matrix metalloproteinase activity to cardiac failure in diabetic cardiomyopathy: the role of angiotensin type 1 receptor antagonism. **Diabetes**. 56(3): 641-6, 2007.

YANG H, WRIGHT JR. Human beta cells are exceedingly resistant to streptozotocin in vivo. **Endocrinology**. 143:2491-5, 2002.